

SÉRIE A. N° 3.269

N° D'ORDRE

4.141



THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

René GOT

1^{re} THÈSE. — GONADOTROPINE CHORIALE HUMAINE,
ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 13 Mai 1959 devant la Commission d'examen.

MM. R. WURMSER..... *Président.*

J. TONNELAT.....	} <i>Examineurs.</i>
E. LEDERER.....	





Digitized by the Internet Archive
in 2026

SÉRIE A. N° 3.269

N° D'ORDRE

4.141

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

René GOT



1^{re} THÈSE. — GONADOTROPINE CHORIALE HUMAINE.
ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 13 Mai 1959 devant la Commission d'examen.

MM. R. WURMSER.....	<i>Président.</i>
J. TONNELAT..	} <i>Examineurs.</i>
E. LEDERER.....	



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen..... J. PERES

G. JULIA.....	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure	JANET.....	T Mécanique analytique et Mécanique céleste
FOCH.....	T Mécan. physique et expérimentale	PETIT.....	T Biologie maritime
DE BROGLIE.....	T Théories physiques	QUENEY.....	T Météorologie et dynamique atmosphérique
PRENANT.....	T Anatomie et Histol. comparées	GALLIEN.....	T Embryologie
PERES.....	T Mécan. des Fluides et applications	EICHHORN.....	T Biologie Végétale (S.P.C.N.)
M. CURIE.....	T Physique (S.P.C.N.)	DE CUGNAC.....	T Biologie Végétale (S.P.C.N.)
BARRABÉ.....	T Géol. struct. et Géol. appliquée	Mlle CAUCHOIS....	T Chimie Physique
J. BOURCART.....	T Géogr. physique et Géol. dynamique	THELLIER.....	T Physique du Globe
PLANTEFOL.....	T Botanique	L'HÉRITIER.....	T Génétique
GRASSÉ.....	T Evolution des êtres organisés	GRIVET.....	T Radioélectricité
PRÉVOST.....	T Chimie organique	PONCIN.....	T Mécanique Générale
BOULIGAND.....	T Application de l'analyse à la Géométrie	DUBREIL.....	T Arithmétique et théorie des nombres
CHAUDRON.....	T Chimie appliquée	QUELET.....	T Chimie organique
WYART.....	T Minéralogie	CAGNIARD.....	T Géophysique appliquée
TEISSIER.....	T Zoologie	CHAMPETIER.....	T Chimie macromoléculaire
MANGENOT.....	T Biol. Végétale	CUVILLIER.....	T Géol. structurale et Géol. appliquée
P. AUGER.....	T Physique quantique et relativité	JUNG.....	T Pétrographie
MONNIER.....	T Physiol. générale	TRILLAT.....	T Microscopie et diffraction électronique
PIVETEAU.....	T Paléontologie	WIEMANN.....	T Chimie organique et structurale
ROCARD.....	T Physique (E.N.S.)	JACQUINOT.....	T Spectroscopie et physique céleste
H. CARTAN.....	T Mathématiques (E.N.S.)	VASSY.....	T Physique de l'Atmosphère
LAFFITTE.....	T Chimie générale	DESTOUCHES.....	T Théories physiques
FAVARD.....	T Géométrie supérieure	M. PRUVOST.....	T Géologie
COULOMB.....	T Physique du Globe	AMIEL.....	T Chimie générale (P.C.B.)
Mlle COUSIN.....	T Biol. animale (S.P.C.N.)	HOCART.....	T Minéralogie
CHRÉTIEN.....	T Chimie minérale	J.-P. MATHIEU....	T Physique (P.C.B.)
P. DRACH.....	T Zoologie	COUTEAUX.....	T Biol. Animale (P.C.B.)
KASTLER.....	T Physique (E.N.S.)	MAY.....	T Biol. Animale (P.C.B.)
EPHRUSSI.....	T Génétique	CHOQUET.....	T Calcul différentiel et intégral
WURMSER.....	T Biologie physico-chimique	FELDMANN.....	T Biologie (P.C.B.)
RIVIÈRE.....	T Géologie (S.P.C.N.)	GUINIER.....	T Physique des solides
GAUTHERET.....	T Biol. végétale (P.C.B.)	JOST.....	T Physiol. comparée
LUCAS.....	T Recherches physiques	FORTET.....	T Calcul des probabilités
A. THOMAS.....	T Biologie cellulaire	SCHWARTZ.....	T Calcul différentiel et intégral
ARNULF.....	T Optique appliquée	CHOUARD.....	T Physiol. Végétale
M. MORAND.....	T Enseignement de Physique	MALAVARD.....	T Aviation
SOLEILLET.....	T Physique	BRELOT.....	T Calcul différentiel
FORTIER.....	T Mécanique expérim. des fluides	NORMANT.....	T Chimie organique
DANJON.....	T Astronomie	BENARD.....	T Chimie (P.C.B.)
LAPORTE.....	T Physique générale et Radio-activité	BUVAT.....	T Botanique (E.N.S.)
		DUGUÉ.....	T Statistiques mathém.
		GELOSO.....	T Chimie (S.P.C.N.)

SOULAIRAC.....	T Psychophysiologie	Mme LELONG.....	T Mathématiques (E.N.S.)
ULRICH.....	T Physiologie Végétale	BELLAIR.....	T Géologie (S.P.C.N.)
MARÉCHAL.....	T Optique théorique et appliquée	COTTE.....	T Physique (A.P.C.)
KIRRMANN.....	T Théories chimiques	DUBOIS J.-E.....	T Chimie (S.P.C.N.)
CHADEFAUD.....	T Botanique	LAMOTTE.....	Zoologie (E.N.S.)
DESTRIAU.....	T Physique (M.P.C.)	LE ROLLAND.....	Mécanique des fluides
Mlle LE BRETON...	T Physiol. Générale	MICHEL André....	T Chimie (S.P.C.N.)
SALEM.....	T Mathématiques Générales	OLMER.....	T Energétique Générale
LELONG.....	T Mathématiques Générales	ROUAULT.....	T Physique Générale
DEVILLERS.....	Anatomie et Histologie comparées	GAUTHIER.....	T Méc. appliquée
EHRESMANN.....	T Topologie algébrique	BARCHEWITZ.....	Chimie Physique
FRANÇON.....	T Physique (S.P.C.N.)	BROSSEL.....	Physique atomique
GLANGEAUD.....	T Géogr. physique et Géol. dynamique	BUSER.....	Biologie animale (P.C.B.)
GODEMENT.....	T Mathématiques (M.P.C.)	CAMUS.....	Biol. Vég. (P.C.B.)
PISOT.....	T Calcul des Probabilités	CASTAING.....	Physique Générale
ROCH E.....	T Géologie	CURIEN.....	Minéralogie et cristallographie
SCHATZMANN.....	Astrophysique	MOYSE.....	Physiologie Végétale
TERMIER.....	T Paléontologie stratigraphique	NOIROT.....	Evolution des êtres organisés
ZAMANSKY.....	T Mathématiques Générales	PANNETIER.....	Chimie (S.P.C.N.)
LENNUIER.....	Physique (M.G.P.)	POSSOMPES.....	Biologie Animale (P.C.B.)
RIZET.....	Génétique	PULLMANN.....	Chimie Théorique
ROUTHIER.....	Géologie appliquée	TEILLAC.....	Physique Nucléaire et Radioactivité
Mme TONNELAT...	T Physique théorique	TONNELAT.....	Biol. physico-chimique
DIXMIER.....	T Mathématiques (M.P.C.)	VILLE.....	Econométrie
SOUCHAY.....	T Chimie générale	WILLEMART.....	Chimie (P.C.B.)
AIGRAIN.....	T Electrotechnique	DODÉ.....	T Chimie
BRUSSET.....	Chimie minérale	FREYMANN.....	T Physique (S.P.C.N.)
M. LEVY.....	Physique théorique	GUINOCHE.....	T Biol. Vég. (ORSAY)
Mme CHAIX.....	Chimie biologique	ROLLET.....	T Chimie (P.C.B.)
Mme HUREL-PY...	Biol. Végétale (P.C.B.)	Mlle JOSIEN.....	T Chimie (P.C.B.)
PIAUX.....	Chimie (P.C.B.)	CHEVALLEY.....	T Géométrie Algébrique et théorie des groupes
BRUN.....	Mécanique expérimentale des fluides	ARNOULT.....	T Physique (ORSAY)
LEDERER.....	T Chimie des substances organiques naturelles	CHAPELLE.....	T Physique (ORSAY)
Mme DUBREIL ...	T Mathématiques	DELANGE.....	T Mathém. (ORSAY)
		DENY.....	T Mathém. (ORSAY)
		GERMAIN P.....	T Méc. théor. des fluides
		LUCAS G.....	T Géologie

Secrétaire Général..... C. MONIER

SOMMAIRE

	Pages
AVANT-PROPOS	3
INTRODUCTION	5
PHYSIOLOGIE DE L'HORMONE	7
I — Historique.....	7
II — Action biologique.....	7
III — Méthodes de dosage.....	8
IV — Variation du titre de l'urine durant l'évolution de la grossesse.....	9
ISOLEMENT ET PRÉPARATION	11
I — Rappel des méthodes antérieures.....	11
II — Caractéristique de l'urine utilisée.....	13
III — Adsorption par l'acide benzoïque.....	14
IV — Extraction aqueuse à pH 4,5.....	16
V — Extraction hydro-alcoolique.....	18
VI — Précipitation au point isoélectrique.....	21
VII — Adsorption sur kaolin.....	22
VIII — Chromatographie sur échangeur d'ions.....	23
PURIFICATION	28
I — Deuxième chromatographie sur Décalso.....	28
II — Chromatographie sur Dowex 2.....	28
III — Electrophorèse de zone sur amidon.....	29
ÉTUDE ÉLECTROPHORÉTIQUE	30
I — Electrophorèse sur papier.....	30
II — Electrophorèse de zone sur amidon.....	33
III — Electrophorèse en veine liquide.....	36
SOLUBILITÉ	40
I — Courbe de solubilité.....	40
II — Caractères de solubilité.....	41
SÉDIMENTATION	42
DIFFUSION	44
VOLUME SPÉCIFIQUE PARTIEL	47
POIDS MOLÉCULAIRE	49
DIFFUSION DE LA LUMIÈRE	50
RAPPORT DE FRICTION	51
POUVOIR ROTATOIRE	53
SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET	54
Détermination spectrophotométrique de la tyrosine et du tryptophane.....	56
RÉSIDUS N-TERMINAUX	58
RÉSIDUS C-TERMINAUX	60
COPULE GLUCIDIQUE	62
I — Méthodes analytiques.....	62 et 65
II — Hydrolyse	64 et 66
III — Chromatographie.....	64 et 66
STABILITÉ	71
ANALYSE DES ACIDES AMINES	75
DISCUSSION	76
CONCLUSION	81
BIBLIOGRAPHIE	82

AVANT-PROPOS

Ce travail m'a été proposé par M. BOURRILLON, Professeur agrégé des Facultés de Médecine, qui en a assuré la direction. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et de ma très vive affection.

Je tiens à remercier M. le Professeur WURMSER qui a bien voulu présider le jury de ma thèse.

J'adresse également mes remerciements à M. le Professeur LEDERER qui a accepté de juger ce travail, et plus particulièrement la partie biochimique.

A M. le Professeur TONNELAT, pour la bienveillance qu'il m'a témoignée les conseils qu'il m'a prodigués, l'intérêt qu'il a porté à mon travail, j'exprime ma reconnaissance.

J'ai trouvé auprès de M. le Professeur JAYLE, qui m'a accueilli dans son laboratoire, une compréhension et une sollicitude qui sont pour moi un encouragement précieux. Qu'il trouve ici le témoignage de mon respectueux dévouement.

INTRODUCTION

Si depuis leur découverte, des progrès considérables ont été accomplis dans l'isolement et la purification des hormones gonadotropes, celles-ci n'ont cependant pas encore été obtenues dans un état de pureté satisfaisant. En comparaison de l'ACTH, elles n'ont reçu, ces dernières années, que relativement peu d'attention de la part des biochimistes; aussi paraît-il désirable de reprendre leur étude par des méthodes plus modernes de fractionnement, afin d'en éliminer toutes les impuretés, dont certaines peuvent avoir une action physiologique parasite.

Les gonadotropines sont des glycoprotéines (à la chaîne polypeptidique est liée une copule glucidique) : la préparation et la purification des glycoprotéines se heurtent en général à de grandes difficultés, et demeurent délicates; de plus leur constitution a tenu en échec tous les moyens d'investigations jusqu'à la mise au point de méthodes analytiques suffisamment fines pour caractériser leurs constituants. La dualité structurale des glycoprotéines achève d'ailleurs de compliquer le problème.

La pureté du produit final doit être le but de toute nouvelle préparation, mais il faut définir et vérifier cette pureté, et les méthodes généralement employées pour les composés chimiques simples, ne peuvent s'appliquer aux protéines. Il faut s'en rapporter à certaines propriétés particulières de la molécule qui peuvent être de nature physicochimique ou biologique. Si l'on peut démontrer que la protéine possède l'ensemble de ces propriétés, il est tout à fait probable qu'elle est une substance pure.

Les critères que l'on peut considérer comme satisfaisants, sont l'électrophorèse, l'ultracentrifugation, la diffusion, la solubilité et l'activité biologique.

Les gonadotropines ont deux origines : l'hypophyse et le placenta. Ce sont les hormones hypophysaires qui ont été l'objet du plus grand nombre de travaux dans un passé récent : par suite, elles ont été mieux étudiées, leur connaissance est plus approfondie, et leur préparation s'approche davantage de la pureté.

Et cependant, l'hormone chorale, la plus négligée sur le plan biochimique, est la seule gonadotropine qui soit d'origine humaine, les autres étant extraites de l'hypophyse de mouton ou de porc, ou du sérum de jument gravide (la gonadotropine hypophysaire extraite de l'urine normale ou de femme ménopausée n'a encore été que peu étudiée). La formation d'anti-hormones durant l'administration de ces substances, ne peut qu'accroître l'intérêt que présente la préparation d'hormones isolées de tissus ou de liquides humains.

Découverte dans l'urine de femme enceinte en 1927, par ASCHHEIM et ZONDEK, l'origine placentaire de l'hormone chorale est maintenant bien établie. Son activité biologique nettement caractérisée — stimulation des cellules interstielles chez le rat hypophysectomisé, lutéinisation chez l'être humain — lui a valu une utilisation fréquente en thérapeutique.

De nombreuses techniques de préparation ont été publiées, mais aucune d'elles ne semble avoir abouti à un produit que l'on puisse définitivement classer dans le groupe des protéines pures.

Cependant, il est maintenant démontré que les préparations impures risquent de contenir, parmi leurs impuretés, une hormone à action folliculo-stimulante.

L'intérêt que présente l'obtention d'une hormone véritablement pure est donc évident. Tel est le but de ce travail : une méthode d'isolement et de purification, aboutissant à un produit final dont la pureté soit démontrée par l'ensemble des critères classiques.

Mais, la progression d'une méthode de préparation d'hormone protéique, à partir de sources naturelles, est étroitement liée aux essais biologiques qui guident l'extraction. La physiologie de l'hormone chorale, qui primitivement servit de base aux diagnostics de grossesse, a été très étudiée : des tests de dosage précis et sensibles ont été établis ces dernières années, permettant, grâce à l'adoption d'un Standard International, une estimation en valeur absolue de l'activité spécifique des extraits obtenus.

Un dernier élément, favorable, est la relative facilité avec laquelle on peut se procurer la matière première — l'urine de femme enceinte — dont la disponibilité ne connaît pas de limites.

PHYSIOLOGIE DE L'HORMONE CHORIALE

I. — HISTORIQUE

La présence dans le sang et l'urine de femme enceinte d'une substance à activité gonadotrope (c'est-à-dire stimulant les gonades), capable de produire une maturité précoce chez les rongeurs impubères, fut montrée en 1927 par ASCHHEIM et ZONDEK [1] : les auteurs la dénommèrent « Prolan ». Quoique cette découverte servit de base à un diagnostic de grossesse (ASCHHEIM et ZONDEK 1928, FRIEDMAN 1929) [2], elle ne fut pas distinguée à priori de l'hormone hypophysaire, et une confusion régna pendant plusieurs années quant à l'origine des divers facteurs gonadotropes humains.

Si HIROSE [3] dès 1920, puis plus tard ASCHHEIM (1927), MURATA et ADACHI (1927) [4] montrèrent que le placenta contient une substance gonadotrope, il fallut attendre plusieurs années pour que des données expérimentales soient présentées, prouvant que le principe gonadotrope qui apparaît durant la grossesse, émane du placenta et non de l'hypophyse (ENGLE 1929, COLLIP 1930, 1934, 1935, COLLIP, SELYE, ANDERSON et THOMSON 1933, HAMBURGER 1933, PHILLIP 1930, DEANESLY 1935) [5].

La démonstration que la gonadotropine pouvait être produite « in vitro » dans des cultures de tissu placentaire, particulièrement de cellules de Langhans (SANNICANDRO 1934, GEY, SEEGAR et HELIMAN 1938, SEEGAR-JONES, GEY et GEY 1943, STEWART, SANO et MONTGOMERY 1948) [6] est la plus convaincante, cependant qu'une preuve supplémentaire de l'origine placentaire était apportée par les études histochimiques (WISLOCKI et BENNET 1943, ZILLIACUS 1953) [7] et par des expériences de transplantations oculaires de tissu chorionique (KIDO 1937, STEWART 1951) [8].

Aussi les anciennes appellations de « prolان de grossesse » ou « substance anté-hypophysaire-like » furent-elles abandonnées au profit de la dénomination actuelle : gonadotropine chorionique humaine, ou hormone choriale. (H.C.)

II. — ACTION BIOLOGIQUE

Les premières observations étaient effectuées sur des animaux intacts : aussi furent-elles mal interprétées, car on n'avait pas pris en considération la participation possible de la propre hypophyse de l'animal testé. L'utilisation d'animaux hypophysectomisés permit d'éclaircir cette confusion. Les effets chez les animaux intacts et hypophysectomisés sont en contraste aigu par suite du synergisme de l'hormone choriale avec les gonadotropines hypophysaires de l'animal intact (LEVIN 1944, NOBLE et PLUNKETT 1955) [9].

Ainsi, chez le rat femelle intact, l'injection de H.C. est suivie d'une hypertrophie ovarienne due au développement folliculaire et à la formation de corps

jaune, alors que chez l'animal hypophysectomisé, on observe seulement une stimulation des cellules intersticielles (COLLIP, SELYE et THOMSON 1933, LEONARD et SMITH 1934) [10], sans développement folliculaire, avec une légère hypertrophie ovarienne et une sécrétion accrue d'œstrogènes. Cependant, si les ovaires des animaux hypophysectomisés contiennent des follicules à maturité, H.C. est alors capable de les convertir en corps jaune (LEONARD et SMITH 1934) [11], généralement atrophique. De même, chez le rat mâle intact, H.C. stimule tous les éléments testiculaires, avec une hypertrophie résultante des testicules et des organes sexuels secondaires, alors que chez le mâle hypophysectomisé, on n'obtient qu'une stimulation des cellules intersticielles avec production d'androgènes; le tissu spermatogénique peut être maintenu (EVANS et SIMPSON 1950, LIU et NOBLE 1939) [12]. Chez le cobaye où aucun synergisme ne se produit, la réponse est identique à celle des rats hypophysectomisés (LEONARD 1934) [13].

Ainsi, une remarquable propriété de H.C. est l'action synergique qu'elle exerce quand elle est combinée avec l'hormone folliculo-stimulante hypophysaire : l'accroissement de poids ovarien résultant de l'injection combinée de ces deux hormones est bien supérieure à la somme des poids obtenus par des essais séparés (EVANS, MEYER et SIMPSON 1932, LEONARD 1932, FÉVOLD et HISAW 1934) [14]. Une relation bien définie entre les deux hormones semble régler le synergisme (SIMPSON, LI et EVANS 1951) [15], et elle peut être utilisée pour le dosage du facteur F.S.H. (STEELMAN et POHLEY 1953) [16].

Chez l'homme, l'observation de BROWN et BRADBURY (1947) [17] que H.C. a une action lutéotrope, a été confirmée par SEGALOF, STERNBERG et GASKILL (1951) [18]. L'injection intraveineuse de H.C. purifiée produirait un développement folliculaire et une hémorragie utérine chez la femme (CLAESSION et coll. 1948) [19].

Cependant, récemment LYONS, SIMPSON et EVANS (1953) [20] montrèrent que des extraits d'urine postérieure au 33^e jour de grossesse possédaient une activité folliculo-stimulante en addition aux propriétés lutéinisantes bien établies : aussi, la plupart des préparations étant effectuées à partir d'urines prélevées aux alentours du 50^e jour de grossesse, leur pureté n'étant en général pas démontrée, on peut admettre qu'elles contenaient toutes de petites quantités de FSH.

III. — MÉTHODES DE DOSAGE

Les estimations de H.C. furent d'abord entreprises comme un moyen de diagnostic de gestation.

Formation de corps jaunes ou de points hémorragiques sur les ovaires de souris (ASCHHEIM et ZONDEK 1928) [21], ovulation chez la lapine (FRIEDMAN 1929, FRIEDMAN et LAPHAM 1931) [22], ovulation chez le crapaud sud-africain *Nenopus laevis* (HOGGEN, CHARLES et SLOME 1931, LANDGREBE 1948) [23] ou chez la souris pubère (BURDICK 1946) [24], émission de spermatozoïdes par le crapaud mâle (GALLI-MAININI 1947) [25], hypertrophie utérine (HELLER, LAUSON et SEVRINGHAUS 1938) [26], œstrus vaginal chez le rat femelle impubère (ASCHHEIM 1942) [27], tels furent les principaux de ces tests dont BARLOW et SPRAGUE (1941) [28] étudièrent la sécurité.

De nombreux chercheurs tentèrent, ces dernières années, d'augmenter la précision et la spécificité des dosages de gonadotropines. L'adoption en 1938 (S.D.N., Bulletin d'organisation de l'hygiène, 1939) [29] d'un Standard International permit d'exprimer l'activité de H.C. en Unités Internationales, et d'éliminer ainsi la trop grande variété d'« unités animales » employées jusqu'ici. La sensibilité des différentes méthodes put alors être comparée (GADDUM 1950, DICZFALUZY 1953, 1954, DICZFALUZY et LORAIN 1955, BUKOVICS et WOHLZOGEN 1953) [30].

Des essais de dosages par des méthodes chimiques (CROOKE, BUTT, INGRAM et ROMANSHUCK 1954, BOWMAN 1941, STRAN et SEEGAR-JONES 1954) [31] ne semblent pas devoir être pris en considération : tant que ces méthodes ne seront pas spécifiques, il est peu probable qu'elles puissent remplacer les techniques biologiques (LORAIN 1956) [32].

Par définition, une Unité Internationale (UI) est l'activité contenue dans 0,1 mg du Standard International. Chaque souche d'animaux pouvant réagir avec une sensibilité propre, il importe d'utiliser des animaux qui, s'ils ne sont pas de race pure, doivent au moins provenir d'un élevage homogène. De plus, chaque dosage doit être effectué contre un témoin : comme il est impossible d'utiliser à

chaque fois la préparation étalon internationale, un « standard auxiliaire » était créé, servant de témoin pour chaque série d'essais, testé périodiquement contre le Standard International.

Les méthodes quantitatives de dosage de H.C. sont très nombreuses. Les rats et les souris impubères intacts ont été particulièrement utilisés. Les tests peuvent être classés en deux groupes, selon que l'effet est primaire ou secondaire. Le premier groupe est considéré comme présentant des désavantages considérables (LORAINÉ 1956) [33]. Dans le second groupe, la majorité des essais est effectuée sur des rats intacts impubères. Mis à part le poids d'utérus (EVANS 1936) [34] et l'œstrus (BROWNE et VENNING 1936) [35] imprécis, trois méthodes ont une précision sensiblement équivalente (DICZFALUSY 1954, LORAINÉ 1950) [36] : poids de prostate, poids des vésicules séminales (WATTS et ADAIR 1943, DICZFALUSY, HOGBERG et WESTMAN 1950, SEALEY et SONDERN 1940) [37], poids total prostate-vésicules séminales.

DICZFALUSY (1954) [38] déclarait que ces trois tests sont probablement les méthodes de choix pour le dosage de H.C.

Pour des raisons de plus grande facilité de dissection, le test d'augmentation de poids des vésicules séminales fut choisi. Les rats d'un même élevage, âgés de 20-24 jours, pesant 24-30 g (dans ces limites, la variation de poids corporel est sans incidence sur la précision du test), recevaient quotidiennement par voie sous-cutanée, pendant trois jours, une injection de 1 ml d'une solution dans le sérum physiologique de la préparation à titrer. Les animaux étaient sacrifiés 72 heures après la première injection. Les vésicules séminales, soigneusement disséquées, étaient séchées entre deux feuilles de papier filtre et pesées immédiatement. Pour chaque série d'essais, deux doses de standard auxiliaire, 1 UI et 2 UI, étaient injectées, chacune à 10 animaux, servant ainsi de témoins. Généralement, chaque fraction était titrée sur 10 animaux, une hypothèse étant faite sur le titre inconnu, de façon que l'on injecte de 0,5 à 3 UI par animal. Si l'activité réelle s'écartait trop de l'hypothèse, le dosage était recommencé après modification de celle-ci en fonction du résultat obtenu.

Lorsqu'on voulait tracer une courbe d'activité biologique, en titrant une série de fractions (électrophorèse), chacune de celles-ci était titrée sur 4 à 6 animaux.

Par contre, les fractions importantes, correspondant aux principaux stades de la préparation, étaient titrées sur 20 animaux. Enfin, les hormones finales étaient titrées par un essai quatre points.

Ce test, ainsi pratiqué, nous a toujours donné satisfaction : sa précision convenable et sa constance sont pour une bonne part dans le succès de la méthode de préparation.

IV. VARIATION DU TITRE DE L'URINE DURANT L'ÉVOLUTION DE LA GESTATION

L'apparition de H.C. dans l'urine est liée à la fécondation dont la date est soumise aux fluctuations de la période d'ovulation à l'intérieur du cycle menstruel, lui-même variable. Quoiqu'il en soit, le moment d'apparition est maintenant déterminé à quelques jours près. A ce propos, il faut préciser la date de référence de la gestation. Certains auteurs prennent ainsi la dernière période menstruelle, d'autres, d'une façon plus hypothétique, la date des premières menstruations absentes : il semble plus logique d'admettre pour point de départ de la gestation, le quatorzième jour à partir des dernières menstruations réelles. Dans tous les cas, l'erreur que l'on peut faire ne dépasse pas quelques jours et n'a pas grande importance.

ASCHHEIM et ZONDEK (1927) [39] trouvaient que la gonadotropine était détectable dans l'urine deux semaines après les premières menstruations absentes. En fait, il semble qu'on puisse la détecter deux ou trois semaines après la fécondation. Puis, le titre de l'urine augmente rapidement (ASCHHEIM et ZONDEK 1928, ZONDEK 1935, VENNING 1946) [40], et différents auteurs montrèrent l'existence d'un maximum situé entre le 35^e et le 55^e jour de grossesse. Les valeurs de ce maximum, exprimées en unités par 24 heures, sont extrêmement variables : leur expression en « unités animales » ne pouvait qu'accroître ces variations. Les chiffres très élevés que l'on peut rencontrer dans la littérature (plus de 100.000 unités/24 h) semblent excessifs. Récemment, LORAINÉ (1950) [41] trouvait une excrétion maximum de l'ordre de 40.000 UI par 24 heures. Ce titre élevé se maintient 2 à 3 semaines (FOSCO 1943) [42], puis, une décroissance assez rapide se produit, ramenant le niveau d'excrétion entre 3.000 et 10.000 UI/24 h au 120^e jour, ce niveau

reste sensiblement constant jusqu'à la parturition (ALBERT et BERKSON 1951, DICZFALUSY 1953, SMITH, ALBERT et RANDALL 1951) [43], la disparition étant complète dans les 5 à 10 premiers jours du post-partum.

Nous avons pu suivre avec précision deux grossesses et tracer les courbes d'élimination en fonction des jours de gestation : nos résultats sont en accord avec ceux de LORAINE (fig. 1).

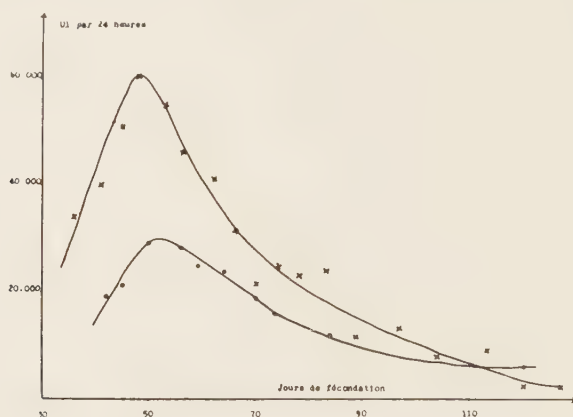


Fig. 1. — Courbe d'excrétion de H.C. en fonction des jours de fécondation.

Les deux maxima (30.000 et 60.000 UI/24 heures) se situent aux environs du 50^e jour de gestation.

Ainsi, la matière première de choix est l'urine collectée entre le 40^e et le 60^e jour de gestation. Il n'est malheureusement pas toujours possible d'opérer avec une telle précision.

ISOLEMENT ET PRÉPARATION

Variées dans leurs moyens et dans leurs fins, simples ou complexes, les techniques d'extraction ou de purification de l'hormone chorale se sont succédées depuis trente ans. Peu d'entre elles, toutefois, conduisirent à une préparation justiciable des critères garants de la pureté des protéines. Maints chercheurs, en effet, se sont préoccupés davantage de la physiologie des gonadotropines. Il est juste de dire que les progrès accomplis dans ce domaine ont rendu possible l'isolement de l'hormone par la spécificité et la sensibilité du test biologique ainsi mis au point.

La simplicité de certaines méthodes était malencontreusement compensée par l'obtention d'hormone impure ; d'autres ne semblaient pouvoir devenir routinières, ou faisaient craindre un résultat inférieur à celui de leurs auteurs. Beaucoup enfin étaient caractérisées par une perte importante de l'activité gonadotrope en cours d'exécution.

I. — RAPPEL DES MÉTHODES ANTÉRIEURES

Les premières techniques, dont le but était moins un produit pur qu'une fraction utilisable en physiologie, employaient la précipitation alcoolique (ZONDEK et ASCHHEIM 1928, EVANS et SIMPSON 1929, ZONDEK 1930) [44] après une concentration de l'urine.

DICKENS (1930) [45] purifiait de semblables fractions grâce à une précipitation par le sulfate d'ammonium à saturation. A des fins identiques SCHMIDT et DERANKOWA (1931) [46] employaient le chlorure de sodium.

A la même époque REISS et HAUROWITZ (1929), et REISS, SCHAFFNER et HAUROWITZ (1931) [47] avaient utilisé l'acétate d'uranyl. ZONDEK, SCHEIBLER et KRABBE (1933) [48] obtenaient une meilleure purification par précipitation à l'acide phosphotungstique ou phosphomolybdique, tandis que KATZMAN et DOISY (1933, 1934) [49] employaient l'acide tungstique ou l'acide molybdique.

Pourtant une étape importante avait été franchie grâce aux méthodes d'adsorption des protéines (ZITTLE 1953) [50].

L'acide benzoïque s'avéra être la substance la plus utilisée dans ce but (KATZMAN et coll. 1932, 1934) [51] et la plupart des méthodes postérieures ont eu pour excellent point de départ l'adsorption directe de l'hormone sur l'acide benzoïque à partir de l'urine.

Toutefois, il faut encore signaler, dans cette première période, la précipitation de l'hormone avec l'iode dans des conditions de faible acidité (MEYER 1937) [52], et la précipitation acétonique de FRANCK et coll. (1935) [53].

La découverte par BROWNE et VENNING (1936) [54], confirmée par EVANS et coll. (1937), SMITH et SMITH (1937) [55], du maximum d'excrétion de gonadotropine chorionique aux alentours du 50^e jour de grossesse, permit l'utilisation d'une matière première plus riche, en récoltant l'urine durant cette période.

GURIN, BACHMAN et WILSON (1938, 1939) [56] utilisèrent une telle urine pour l'isolement de l'hormone. Leur technique qui aboutit à un produit hautement actif, se conduisant comme une substance presque pure à l'électrophorèse, l'ultra-centrifugation et la diffusion (GURIN et coll. 1940) [57], peut se résumer comme suit (GURIN 1944) [58] :

Les urines, collectées entre le 50^e et le 90^e jour suivant la dernière période menstruelle, sont traitées avec l'acide benzoïque (toutes les opérations sont effectuées à 0° C) selon la méthode de KATZMAN et DOISY (1932) [59]. Le filtrat est précipité par l'acétone qui dissout l'acide benzoïque. Les matières organiques insolubles sont séchées : elles contiennent la plus grande partie de l'activité initialement présente dans l'urine, pour un poids de 500 mg par litre et une activité de 30 à 50 unités Friedman par milligramme (1932, 1939) [60]. Le résidu est alors élué par l'éthanol à 50 %, à pH 6. L'extrait est traité par deux volumes d'éthanol absolu froid (concentration finale 75 %) pour précipiter l'hormone. Le produit ainsi précipité est extrait trois ou quatre fois par un tampon acétate de sodium — acide

acétique 0,3 M dans 50 % d'alcool à pH 4,8. Après centrifugation, les surnageants mélangés sont précipités par adjonction d'éthanol jusqu'à une concentration de 75 %. Le précipité obtenu, séché, possède une activité de 1.000 à 3.000 unités Friedman, un litre d'urine donnant environ 8 mg.

L'activité spécifique est élevée jusqu'à 4.000 unités Friedman en agitant vigoureusement avec du chloroforme (100 mg de la fraction à 1.000-3.000 unités, dissous dans 2 ml d'eau glacée, ajustée à pH 5 ; la solution est agitée pendant deux heures avec 0,5 ml de chloroforme) qui, sauvegardant l'hormone, élimine les impuretés protéiques dénaturées par ce traitement.

La phase aqueuse est dialysée pour éliminer les sels, et l'hormone précipitée par l'acétone. L'hormone ainsi isolée est proche de l'homogénéité électrophorétique (GURIN 1940) [61] ; l'ultra-centrifugation et la diffusion la confirment monodispersée (LUNDGREN, GURIN, BACHMAN et WILSON 1942) [62]. Le test de solubilité n'a pas été effectué.

En 1941, SCOTT [63], avec l'adsorption sur kaolin (pH 4, élution par la soude N/10) amenait une possibilité nouvelle pour l'isolement de l'hormone. Après BRADBURY et coll. (1949) [64], LORAINE (1950) [65] reprit ce procédé, précipitant l'hormone par l'acétone.

KATZMAN, GODFRID, CAIN et DOISY (1943) [66] obtenaient un produit de même activité spécifique que celui de GURIN, par adsorption sur Permutite, l'utilisation de la Permutite pour adsorber la gonadotrophine chorale ayant été introduite en 1932 par LEJWA [67].

On peut résumer ainsi cette technique : les urines collectées durant la première moitié de la grossesse, sont ajustées à pH 3,5 avec l'acide acétique glacial, filtrées et passées à travers une colonne de Permutite. On admettait une adsorption complète de 10 litres d'urines passés en une heure à travers une colonne de 10 cm de diamètre contenant 2 kg de Permutite. La colonne est alors lavée avec de l'eau distillée froide jusqu'à obtention d'un effluent neutre et incolore, puis avec l'alcool à 76 %. L'agent éluant est une solution d'alcool à 38 % contenant 10 % d'acétate d'ammonium. On obtient l'hormone par précipitation fractionnée de l'éluat, en augmentant le pourcentage en alcool : l'essentiel de l'activité précipite à 70-75 % d'alcool. Si le produit ainsi obtenu semble avoir une activité importante, il n'a été soumis à aucun test physique de pureté.

MILTON [68] en 1946 utilisait également l'adsorption sur Permutite.

Plus récemment CLAEISSON, HOGBERG, ROSENBERG et WESTERMAN (1948) [69] décrivaient un procédé pour la cristallisation d'une préparation électrophorétiquement homogène, titrant 6.000 à 8.000 UI/mg. Cette technique, dans son premier temps, se rapproche de celle de GURIN. La matière première est l'urine collectée durant les trois premiers mois de grossesse. Son principe actif est adsorbé sur l'acide benzoïque selon KATZMAN et coll. (1932) [70]. Après dissolution de l'acide benzoïque par l'acétone, l'insoluble est repris par un tampon acétate de pH 4,8, M/15. L'extrait obtenu est précipité par l'éthanol à 85 %. Cette opération est répétée sur le précipité : on obtient ainsi 25 à 30 mg par litre d'urine d'une fraction titrant 4.000 à 6.000 UI/mg (soit 120 à 150.000 UI par litre d'urine ?).

500 mg de cette substance sont alors dissous dans 50 ml de tampon phosphate M/15, pH 7,4. Après élimination de l'insoluble, une solution aqueuse de protamine à 10 % est ajoutée goutte à goutte, tant qu'apparaît un précipité que l'on écarte. Le surnageant limpide est alors ajusté à pH 3,5 et amené à une concentration de 50 % en éthanol par addition d'une solution alcoolique contenant 5 % de m-cresol. On laisse reposer deux heures, puis la concentration en alcool est montée à 60 %. L'hormone précipite sous la forme d'une substance amorphe qui, au bout de 24 heures, cristallise en fines baguettes ou aiguilles.

Les auteurs déclaraient que « les études électrophorétiques, dans le tampon phosphate de pH 7 et de force ionique 0,1, mettaient en évidence un seul constituant, même après deux heures, en opposition aux différentes fractions obtenues ». Toutefois ils ne présentèrent pas les clichés de leurs électrophorèses. Puisqu'elle n'a pas été soumise à l'ultra-centrifugation et aux tests de solubilité, la cristallisation n'étant pas un critère de pureté absolu (LI 1949) [71], la préparation de CLAEISSON et coll., peut fort bien contenir des substances contaminantes.

Un autre adsorbant des protéines fut encore utilisé : le phosphate tricalcique (SWINGLE et TISELIUS 1951) [72]. En fait, cette technique chromatographique (BUTT et CROOKE 1953, CROOKE et BUTT 1952, CROOKE, BUTT, INGRAM et ROMANCHUCK 1954) [73] visait, à travers la séparation des différents facteurs

gonadotropes de l'urine (LORAIN et BROWN 1954) [74], principalement la gonadotropine GA non chroionique et plus accessoirement la gonadotropine choriale GB.

A des fins identiques, DRESHER (1954) [75] employait la précipitation par le sulfate d'ammonium.

Citons pour mémoire une extraction simplifiée (HON et MORRIS 1955) [76] dont les buts étaient plus biologiques que chimiques.

Enfin LANDGREBE, HOBSON et MITCHELL en 1954 [77], n'ayant jamais pu obtenir de résultats satisfaisants avec les méthodes antérieures, imaginèrent une nouvelle technique dans laquelle la variation de concentration en acétone jouait un rôle décisif. Son produit final avait une activité de 4.000 UI/mg sans qu'il soit possible de l'améliorer.

A la même époque MORRIS et MORRIS (travail non publié) isolaient un produit ayant pour activité 12.000 UI/mg, par la méthode de KATZMAN (1943) [78] modifiée, à partir d'une urine de chorion épithéliome. Confirmée par l'électrophorèse à 5 pII, l'homogénéité de leur préparation ne résistait pas à la sédimentation et aux tests de pureté (MORRIS 1955) [79]. Il faut insister sur le fait qu'il ne s'agissait pas d'une urine de grossesse normale.

Ce bref rappel des procédés publiés à ce jour nous montre combien ils furent nombreux et variés. Mais craignant de ne pouvoir répéter telle ou telle méthode avec le succès de ses auteurs, ambitionnant un but jamais atteint, il nous parut nécessaire d'édifier une technique originale (quitte à puiser dans l'arsenal des moyens déjà utilisés).

II. — CARACTÉRISTIQUE DE L'URINE UTILISÉE

Définissons d'abord quel fut notre point de départ : l'intérêt est évident de partir d'une urine aussi riche que possible en hormone, c'est-à-dire d'une urine éliminée entre le 50^e et le 70^e jour de grossesse. Nous avons pu, certes, effectuer quelques préparations à partir de telles urines ; malheureusement une semblable précision dans le prélèvement ne s'entend que dans des cas bien définis, et par suite, limités : en l'occurrence, la qualité exclut la quantité. Or, pour mener à bien une étude aussi complète que possible des caractères physiques et chimiques de l'hormone pure, il faut, bien entendu, avoir à sa disposition une quantité de produit considérable.

Aussi fallut-il nous montrer moins exigeant quant à la qualité de l'urine, l'importance des volumes mis en œuvre compensant largement la faiblesse relative de l'activité gonadotrope qu'ils présentaient.

Les plus importantes de nos extractions ont donc été effectuées à partir d'urines collectées entre le 60^e et le 90^e, parfois même le 100^e jour de fécondation : ces urines recueillies sur merthiolate (à la concentration de 1/5.000) étaient stockées en bac à une température inférieure à + 4° C. Le merthiolate évitait toute putréfaction et le stockage permettait la décantation des urines. D'autre part l'importance et la multiplicité des mélanges ainsi réalisés avaient pour effet bienfaisant d'assurer une matière première homogène et toujours identique à elle-même.

Les urines, après des temps plus ou moins longs de stockage, étaient limpides, plus que des urines fraîches, et semblaient avoir conservé toute leur activité.

Avant chaque préparation, quel que soit le volume d'urine mis en jeu, l'activité était dosée. Si, lors des cas isolés, dont il a été question au début de ce paragraphe, nous avons pu travailler sur des urines titrant 30.000 à 40.000 unités au litre, mais de volume restreint (quelques dizaines de litres), par contre les extractions les plus importantes ont été effectuées à partir d'urines titrant 10 à 20.000 unités au litre, la faiblesse relative du titre s'expliquant par la présence, dans ces mélanges, d'urines du 90^e au 100^e jour de grossesse, c'est-à-dire au plus égale à 5.000 unités par litre.

Il faut préciser que ces urines conservées sur merthiolate étaient très peu toxiques : aussi ont-elles pu être dosées par injection directe. En effet, le test des vésicules séminales ne réclamait que 1,5 UI à 2 UI par animal, en trois jours, ce qui représentait, pour des urines titrant 10 UI par millilitre, moins d'un dixième de millilitre par jour. Tous les animaux supportèrent bien ces injections.

Parallèlement, la précipitation alcoolique fut utilisée avec un plein succès : l'urine ajustée à pH 4,5 par l'acide acétique, filtrée, est précipitée entre 0 et + 4° C par quatre volumes d'alcool. On abandonne 12 heures en glacière, puis le précipité est centrifugé, lavé et séché.

Le poids de ces précipités, ramené au litre d'urine, varie entre des limites assez restreintes. Ces précipités ont également pu être dosés directement sans que la

moindre toxicité soit apparue, vraisemblablement pour la même raison que dans le cas de l'urine totale : titre élevé en activité gonadotrope.

Nous fûmes amenés à dialyser quelques précipités alcooliques lorsque, devant injecter un nombre important d'unités (particulièrement dans les études histologiques sur animal hypophysectomisé), les doses s'avéraient dangereuses. Les dialyses étaient effectuées sous eau courante durant 24 heures, ou avec une agitation intérieure pendant 12 heures, dans des enveloppes de cellophane (Visking cellulose). L'insoluble était éliminé par centrifugation en fin de dialyse, le surnageant limpide était précipité par quatre volumes d'alcool à froid, après adjonction de quelques gouttes d'un tampon acétate de sodium — acide acétique de pH 4,5 normal.

TABLEAU I

Activité par litre de l'urine totale et du précipité alcoolique avant et après dialyse.

Urine totale		Précipité alcoolique			Précipité après dialyse		
Origine	Activité (UI par litre)	Poids par litre	Activité (UI par mg)	Activité (UI par litre)	Poids par litre	Activité (UI par mg)	Activité (UI par litre)
50 ^e au 80 ^e jour		4.876	3	14.628			
50 ^e au 80 ^e jour		3.400	5,5	18.700			
50 ^e au 80 ^e jour		4.200	4,75	20.000			
50 ^e au 80 ^e jour		4.140	5,8	24.000			
60 ^e jour	54.000				320	161	51.520
60 ^e au 65 ^e jour		7.350	5,5	32.340			
50 ^e au 60 ^e jour	41.400						
50 ^e au 80 ^e jour	24.000	14.560	1,5	22.000	125	180	22.500
60 ^e au 90 ^e jour	20.000	4.700	3,9	18.330			
60 ^e au 90 ^e jour	18.000						
60 ^e au 90 ^e jour	13.000						
50 ^e au 70 ^e jour	23.000						
60 ^e au 100 ^e jour	13.900						
60 ^e au 100 ^e jour	12.000						
50 ^e au 80 ^e jour	22.000						
70 ^e au 90 ^e jour		1.825	7	12.775			

Les précipités ainsi obtenus étaient complètement débarrassés des sels minéraux ne contenant que les protéines urinaires, de 100 à 300 mg par litre. Ces précipités dosés n'accusaient aucune perte sensible d'activité, ce qui implique évidemment une hormone non dialysable.

Le Tableau I donne quelques résultats à propos de ces différents procédés.

III. — ADSORPTION PAR L'ACIDE BENZOÏQUE

L'activité gonadotrope devant être extraite à partir de quantités d'urine parfois importantes, il fallait pour y parvenir un moyen simple, n'augmentant pas exagérément les volumes à manipuler (comme aurait pu le faire une précipitation, même par trois volumes d'alcool).

Le procédé qui fut utilisé avait fait ses preuves, et pouvait être qualifié de classique, puisque GURIN et CLAEISSON l'avaient déjà retenu : l'adsorption par l'acide benzoïque selon KATZMAN et DOISY (1932) [80].

Dans la technique décrite par ces auteurs, l'urine est acidifiée à pH 5, et 75 ml d'acétone saturé en acide benzoïque sont ajoutés par litre. Le précipité est récupéré sur un filtre de Buchner, lavé avec de l'eau saturée en acide benzoïque et dissous dans l'acétone froid. La substance insoluble dans l'acétone est séchée : elle représente, en quelque sorte, l'hormone brute.

Une technique sensiblement identique fut suivie, dont voici le détail : l'urine, telle qu'elle a été caractérisée plus haut, est ajustée à pH 4,5 par l'acide acétique concentré (le pH initial de cette urine variait assez peu : 6,2 — 6,4). Filtrée sur filtre plissé, elle est ensuite abandonnée au froid (0 — 4° C) jusqu'à ce que sa température s'équilibre. 80 ml d'acétone saturé en acide benzoïque à la même température sont alors ajoutés, par litre, avec une agitation mécanique de

45 minutes. On laisse reposer une nuit. Le lendemain, l'acide benzoïque ayant sédimenté pendant la nuit, on siphonne une partie importante du liquide surnageant, le reste est filtré sur Buchner.

Ici intervient un détail technique qui s'est avéré très important, sinon pour l'ensemble de la purification, au moins pour le résultat de l'opération en cours : le gâteau d'acide benzoïque doit être séché, autant qu'il est possible, sur le Buchner. En effet, plusieurs préparations ont été effectuées sur des volumes d'urine tels qu'il fallut filtrer le gâteau d'acide benzoïque sur filtre-pressé. Le séchage étant très inférieur à celui du Buchner, le gâteau restait imprégné d'urine, et, lors de la dissolution de l'acide benzoïque par l'acétone, on précipitait suffisamment d'impuretés pour augmenter très sensiblement le poids du précipité qui, par suite, avait une activité spécifique plus faible. Il est bon d'ajouter que le rendement de l'opération n'était pas abaissé, et que cet inconvénient ne se répercutait pas sur la fin de la purification.

Le gâteau d'acide benzoïque est alors remis en suspension dans une solution aqueuse saturée en acide benzoïque, à 0 - 4° C, pour un volume de 100 ml par litre d'urine initiale. Le lavage s'effectue pendant deux heures en glacière avec agitation mécanique.

Puis la suspension est filtrée sur Buchner, et séchée dans les mêmes conditions que précédemment, un inconvénient identique résultant d'un séchage moins poussé.

Une remarque s'impose au sujet du lavage : GURIN [81] lavait son gâteau benzoïque sur Buchner. Il prétendait qu'un lavage prolongé, s'il ne dissolvait pas l'hormone, provoquait une mise en suspension du précipité hormonal dans l'acétone utilisé pour dissoudre l'acide benzoïque. A moins que l'on ajoutât des sels, cette suspension subsistait, difficile à récupérer par filtration ou centrifugation, et pouvait contenir 75 % de l'activité urinaire initiale.

Bien que notre lavage durât deux heures, jamais rien de semblable ne fut remarqué. Par contre nos poids d'adsorbat benzoïque étaient beaucoup plus faibles que ceux du produit A de GURIN : moins de 100 mg par litre contre 500 mg.

La raison en est peut-être dans la différence des lavages : un argument en faveur de cette explication se retrouve dans le cas du gâteau filtré sur filtre-pressé, qui devait être lavé « in situ », comme GURIN lavait sur Buchner ; les poids d'adsorbat benzoïque obtenus alors, 300 à 400 mg, se rapprochaient des poids de GURIN.

L'acide benzoïque est alors dissous dans une quantité suffisante d'acétone froid pour que le pourcentage de ce dernier soit au moins égal à 80 %. Pour ce faire, on mesurait le volume final de la solution : connaissant le volume d'acétone ajouté, on obtenait immédiatement le pourcentage, la possibilité restant d'ajouter de l'acétone pour augmenter sa concentration en cas d'insuffisance. On laisse déposer une nuit. Le résidu protéique ayant sédimenté, une bonne partie de l'acétone pouvait être décantée. Une centrifugation permet d'obtenir l'insoluble, qui est lavé deux fois par l'acétone froid, une fois par l'éther sec (conservé sur sodium). Le produit séché au dessiccateur sur Cl_2Ca est appelé adsorbat benzoïque (AB) : il se présente sous l'aspect d'une poudre brun foncé.

KATZMAN ajustait son urine à pH 5. L'influence éventuelle du pH de l'urine sur le poids et l'activité d'AB a donc été étudiée (bien entendu dans des limites assez restreintes, de pH 3,5 à pH 5,5). Une première expérience montra que le pH de l'urine avant l'adsorption (*) ne semble pas avoir une grande influence sur le poids d'AB obtenu.

Une deuxième expérience confirma la première, quant au poids, mais précisa que pour des pH trop acides, le rendement de l'adsorption chute de 50 %. Par contre, il semble bien que le pH soit sans influence entre 4,5 et 5,5.

Le Tableau II résume ces expériences.

TABLEAU II
Influence du pH de l'urine sur l'adsorption benzoïque.

Quantité d'urine	pH	Poids de l'AB	UI mg	Activité totale
1.500 ml	3,25	144 mg		
1.500 ml	4	131 mg		
1.500 ml	4,5	137 mg		
1.500 ml	5	134 mg		
300 ml	3,5	34 mg	97	3.298
300 ml	4,5	31 mg	184	5.704
300 ml	5,5	30,5 mg	196	5.978

(*) Il est évident que le pH de l'adsorption est plus acide puisqu'on ajoute de l'acide benzoïque (cf. RIMINGTON et ROWLANDS, Biochem. J. 1941, 35, 786 et 1944, 38, 54). Cependant, le pH de l'urine avant l'adsorption peut se fixer plus aisément, et son influence est certaine ainsi qu'en témoignent les résultats du Tableau II.

Si le rendement, en accord avec les lois de l'adsorption n'est pas de 100 %, il s'est toujours avéré excellent, quelle que soit l'urine de départ.

On trouvera dans le tableau III quelques exemples d'adsorption benzoïque.

TABLEAU III

Exemples d'adsorptions benzoïques.

Urine (UI/litre)	Adsorbat benzoïque		
	mg/litre	UI/mg	UI/litre
14.500	92	133	12.136
12.000	76	130	9.880
20.000	75,5	232	17.500
26.000	344	70	24.080
22.000	92	200	18.400
20.000	76,3	244	18.312

Il nous a paru intéressant de rechercher ce que devenaient les unités manquantes : on devait les retrouver soit dans le filtrat du gâteau benzoïque, soit dans l'eau de lavage, ainsi qu'en témoigne le Tableau IV, où l'on trouve, rapportée au litre d'urine, la répartition de l'activité entre les différentes fractions. (Le filtrat et l'eau de lavage furent dosés soit par leur précipité à quatre volume d'alcool, soit par injection directe après évaporation de l'acétone).

TABLEAU IV

Répartition de l'activité au cours de l'adsorption benzoïque.

Urine	AB	Filtrat	Lavage
12.000	10.000	1.200	
24.000	21.700	1.600	600
30.000	25.000	2.200	1.000

Nous nous trouvions ainsi en puissance d'une hormone brute, obtenue par un procédé sûr, ayant fait ses preuves, d'un rendement excellent, applicable à des quantités importantes.

IV. — EXTRACTION AQUEUSE A PH 4,5

Cette substance, particulièrement difficile à solubiliser (ce qui en rendait le dosage physiologique assez délicat), était plus maniable que l'urine dont on l'avait extraite, mais il paraissait prématuré de la soumettre à des techniques plus fines, avant d'en avoir, en quelque sorte, éliminé la gangue.

Ce caractère même d'insolubilité, auquel l'hormone devait échapper, nous entraîna donc à essayer des extractions aqueuses à divers pH.

Une extraction en milieu alcalin (pH 8,9) fut un échec complet : la quasi-totalité de l'adsorbat se remettait en suspension — sinon en solution — avec impossibilité d'obtenir un sédiment à une vitesse de centrifugation normale.

Des extractions furent alors essayées comparativement par l'eau distillée et par un tampon acétate de sodium — acide acétique M/15, de pH 4,5.

L'extraction était effectuée à froid, en trois temps, avec une heure d'agitation, par des volumes décroissants de solvant, de telle sorte que le rapport poids de la substance à extraire sur volume de l'extrait soit de 1/40.

Enfin pour parfaire la comparaison, deux méthodes de précipitation de l'extrait furent utilisées : l'acétone et l'alcool à cinq volumes.

Le tableau V résume l'expérience qui est nettement en faveur du tampon acétate, la différence entre l'acétone et l'alcool n'étant guère sensible.

TABLEAU V

Essais d'extractions aqueuses de l'adsorbat benzoïque.

Produit initial (AB)			Solvant	Précipitant	Précipité		
Poids (mg)	UI au mg	UI (total)			Poids (mg)	UI au mg	UI (total)
125	140	17.500	eau	Alcool	25	560	14.000
125	140	17.500	pH 4,5	—	27	620	16.700
125	140	17.500	eau	Acétone	30	440	13.200
125	140	17.500	pH 4,5	—	27	640	17.280

La purification étant de 80 % avec un rendement plus que satisfaisant, l'extraction par le tampon acétate de pH 4,5, dans les conditions précisées ci-dessus, suivie d'une précipitation de l'extrait par cinq volumes d'acétone, fut adoptée.

Toutes les extractions effectuées ne furent pas aussi favorables : quelque activité se trouvait perdue dans le résidu (R). Toutefois, le précipité obtenu (P) titrait régulièrement plus de 600 UI/mg, sauf dans le cas de préparations importantes déjà signalées, où l'adsorbat benzoïque était par trop chargé d'impuretés. Il faut préciser que ces extractions étaient toujours effectuées à partir de l'adsorbat benzoïque séché : un essai direct sur l'adsorbat, immédiatement après sa centrifugation et son lavage par l'acétone, sembla se solder par un échec, non quant au rendement, mais au point de vue purification, car le précipité P obtenu, s'il contenait l'essentiel de l'activité de l'urine initiale (18.700 UI par litre), ne titrait que 275 UI au mg pour 60 mg par litre (16.500 UI par litre).

D'une façon plus générale, au cours de la préparation, les procédés suivants furent toujours appliqués :

1° Tous les précipités étaient lavés par l'acétone, puis par l'éther, enfin séchés sur Cl_2Ca au dessicateur et conservés ainsi en glacière.

2° Toutes les solutions étaient tamponnées au pH voulu.

3° Toutes les précipitations, effectuées bien entendu à froid, étaient abandonnées une nuit en glacière avant la centrifugation.

Le tableau VI donne quelques valeurs obtenues pour le précipité P.

TABLEAU VI

Exemples d'extractions de l'adsorbat benzoïque par le tampon acétate de pH 4,5.

AB		P			R		
Poids (mg)	Poids (total mg)	Poids par litre	UI au mg	UI (total)	Poids (mg)	UI au mg	UI (total)
3.600	915	18,5	760	700.000	2.400	30	72.000
5.090	843	17			3.335	20	66.700
2.840	165	23	820	135.300	2.245		
1.500	106	35	600	63.600	1.100	5	5.500
3.770	565	11,5	800	452.000	2.225	30	66.750
1.570	83	21	1.000	83.000	1.277	5	6.385
4.615	240	24	843	202.320	4.155	2	8.310
5.740	2.330	27	770	1.794.000	3.000	30	90.000
7.330	1.405	15	800	1.124.000	5.430	35	190.000
7.550	1.220	12,5	960	1.172.200	6.050	150	907.500
1.950	785	28	700	549.500	1.085		
240.810*	40.100	57	370	14.837.000	200.000	4	800.000
*	60.000	57	135	8.100.000	273.000		
*	9.200	26	462	4.250.400			
*	43.000	24,5	350	15.050.000			

(*) Ces préparations, partant de volumes d'urine importants, présentent l'inconvénient que nous avons déjà exposé. On remarque, en effet, la faiblesse relative de l'activité spécifique de P. Toutefois, ce défaut était sans incidence sur le produit final.

Il ressort de ce tableau que l'extraction de l'adsorbat benzoïque, ainsi qu'elle a été pratiquée, amène une purification importante en poids (60 à 90 %), avec une perte d'activité relativement faible dans le résidu (5 à 10 % de l'activité extraite dans P).

Les poids de P, rapportés au litre d'urine, oscillent entre des limites assez voisines, de même que le titre en UI par milligramme.

Si le résidu R conservait l'aspect de l'adsorbat benzoïque, le précipité P se présentait comme une poudre blanche, légèrement ombrée. Il est juste de dire que, remise en solution, elle donnait un liquide très coloré.

V. — EXTRACTION HYDRO-ALCOOLIQUE

Ce produit beaucoup plus maniable, semblait justifier alors une extraction faisant intervenir les solvants organiques.

Divers essais avec l'acétone à 45 % dans l'eau, n'ont pas été jugés suffisamment probants, d'autant plus que l'acétone étant très volatil, il était difficile, même à 0° C, de maintenir constante sa concentration au cours d'une extraction effectuée en plusieurs temps, avec agitation et centrifugations.

Le Tableau VII résume ces essais.

TABLEAU VII

Essais d'extraction de P par l'acétone à 45 % dans l'eau.

P			Insoluble acétone 45 %			Extrait acétone 45 %		
UI (par mg)	Poids (mg)	UI (total)	UI (par mg)	Poids (mg)	UI (total)	UI (par mg)	Poids (mg)	UI (total)
760	783	595.000	390	383	150.000	1.400	317	450.000
900	520	470.000	200	175	35.000	1.300	325	422.500
850	430	365.000		61		900	340	306.000
770	2.300	1.770.000	95	592	56.000	963	1.636	1.575.500
655	1.360	890 000		170		800	1.088	870.000

Il ressort nettement que le gain d'activité spécifique était en général trop modeste pour justifier cette opération.

GURIN [82] qui effectuait une extraction par l'acétone aqueux à 30 ou 40 %, renonça, lui aussi, à ce procédé devant l'irrégularité de ses résultats. Toutefois, il observait une perte d'activité importante qu'il attribuait à une inactivation de l'hormone par contact prolongé avec l'acide, car il opérait à pH 4,5. Il faut remarquer cependant que cette inactivation ne se produisait qu'au bout de 24 heures, ce qui semble bien long pour une extraction.

Nos extractions n'ont jamais dépassé trois heures, ceci en trois étapes n'excédant pas une heure chacune.

Un fractionnement par l'alcool en milieu tamponné par le tampon acétate de sodium-acide acétique de pH 4,5, M/15, fut alors envisagé.

MEYER et coll. (1953, 1956) [83], étudiant les mucopolysaccharides du tissu conjonctif, les séparaient par fractionnement alcoolique de leur sel de calcium. Par analogie, on pouvait tenter de séparer les mucoprotéines urinaires en se fondant sur la différence de solubilité de leurs sels de calcium en milieu hydro-alcoolique.

Un sel de calcium (chlorure ou acétate), parfaitement soluble dans l'alcool à 50 %, fut donc ajouté à l'extrait hydroalcoolique.

Les résultats réunis dans le Tableau VIII mettent en évidence une insolubilisation importante des mucoprotéines urinaires après adjonction de chlorure de calcium à l'extrait à 50 % d'alcool à pH 4,5.

(L'extrait final était obtenu par précipitation en montant le pourcentage d'alcool à 80 %).

TABLEAU VIII

Exemples d'insolubilisation de mucoprotéines sous forme de sel de calcium.

Produit initial			Insoluble à 50 % d'alcool			Insoluble après adjonction de Cl_2Ca			Produit final		
Poids (mg)	UI/ mg	UI (total)	Poids (mg)	UI/ mg	UI (total)	Poids (mg)	UI/ mg	UI (total)	Pds (mg)	UI/ mg	UI (total)
100	1.300	130.000	13			22			62	2.000	124.000
1.500	462	2.079.000	1.800	20	36.000	1.800	300	540.000	880	1.460	1.285.000
270	840	226.800	70	50	3.500	57	130	7.400	108	1.800	195.000

Par la suite, les extractions furent directement effectuées par l'alcool à 50 %, en milieu tamponné à pH 4,5, contenant du Cl_2Ca ; on n'obtenait ainsi qu'un seul insoluble qui comprenait les protéines insolubles à 50 % d'alcool et les mucoprotéines insolubles sous forme de complexe calcique.

Un essai avec le chlorure de Barium donna des résultats identiques au calcium.

Il fallait alors préciser la concentration en Cl_2Ca donnant les résultats les plus favorables. Un essai comparatif, mettant en jeu différentes molarités de Cl_2Ca , est résumé dans le Tableau IX.

TABLEAU IX

Détermination de la molarité en sel de calcium.

Produit initial			Molarité en Cl_2Ca	Poids (mg) de l'insoluble	Produit final		
Poids (mg)	UI/mg	UI (total)			Poids (mg)	UI/mg	UI (total)
30	1.200	36.000	0,005 M	17	13	1.800	23.400
30	1.200	36.000	0,015 M	14,5	12,5	2.760	34 500
30	1.200	36.000	0,075 M	11,5	13	2 500	32 500

Une concentration molaire de 0,015 M est assez nettement la plus favorable.

Afin de tirer le parti maximum de cette extraction hydroalcoolique, l'hormone ne précipitant pas avant 60 % d'alcool, le pourcentage en alcool de l'extrait fut amené à 55 %, après élimination de l'insoluble à 50 %. Un précipité fut ainsi obtenu, toutefois peu important.

Voici le schéma détaillé de cette extraction, qui s'avéra être particulièrement bénéfique, grâce surtout à cette propriété du calcium.

Un poids 10 x mg d'hormone, généralement au stade P (certaines de ces extractions ont été effectuées sur un produit ayant subi déjà une extraction par l'acétone à 45 %, et possédant par suite un titre légèrement supérieur) est repris en trois fois, avec chaque fois 45 minutes d'agitation mécanique en chambre froide, par un volume total de x ml d'alcool à 50 % dans le tampon acétate M/15 de pH 4,5 contenant du Cl_2Ca à une concentration de 0,015 M.

L'insoluble centrifugé est lavé et séché, selon la méthode habituelle. Les surnageants limpides sont réunis et amenés à un pourcentage de 55 % en alcool par adjonction d'alcool absolu, puis abandonnés une nuit en glacière. Le lendemain matin, l'insoluble à 55 % est centrifugé et lavé.

Le surnageant limpide est amené à 80 % d'alcool. L'hormone est ainsi précipitée.

— Il faut ici ouvrir une parenthèse : on voit que, depuis l'adsorbat benzoïque, deux extractions à pH 4,5, dans le tampon acétate, ont été pratiquées, la première aqueuse, la seconde à 50 % d'alcool en présence de Cl_2Ca . On pouvait donc être tenté d'enchaîner les deux opérations. Au lieu de précipiter l'extrait de l'adsorbat benzoïque par 5 volumes d'acétone, on y dissoudrait du Cl_2Ca à une concentration de 0,015 M, puis on ajouterait un volume d'alcool. On éliminerait le premier précipité, on monterait le surnageant à 55 % en alcool, un deuxième précipité serait alors écarté, et le surnageant serait amené à 80 % d'alcool afin de précipiter l'hormone.

TABEAU X
Exemples d'extractions hydroalcooliques en présence de calcium.

Produit initial			Insoluble à 50 % d'alcool			Insoluble à 55 % d'alcool			Produit final		
Poids (mg)	UI/mg	UI (total)	Poids (mg)	UI/mg	UI (total)	Poids (mg)	UI/mg	UI (total)	Poids (mg)	UI/mg	UI (total)
30	1.300	39.000	10	300	3.000	6			13,5	2.600	35.000
1.000	963	963.000	722	124	90.000	101	447	45.000	106	5.425	545.000
826	1.200	991.000	360	149	53.640	57	800	45.600	392	2.250	882.000
1.195	960	1.147.000	625	145	90.625	80	450	36.000	430	2.250	967.000
33.800	550	18.600.000	20.400	100	2.040.000	2.600	300	780.000	7.980	1.820	14 523.000
785	700	550.000	380			27			312	1.670	521.000
60.000	137	8.100.000	52.000	20	1.040.000	825			5.760	1.200	6.912 000
760			310	53	16.430	60	165	5.900	180	2.400	432.000
4.000	350	1.715.000	2.966	37	109.700	446	300	133.800	1.320	1.120	1.452.000

Un essai réalisé de cette manière donna les résultats suivants : 26 litres d'urine titrant 20.000 UI par litre (520.000 UI au total) avaient produit 2.270 mg d'adsorbat benzoïque (92 mg par litre). On obtint après la première extraction aqueuse un résidu R de 1.480 mg, puis un précipité à 50 % d'alcool en présence de Calcium pesant 310 mg et titrant 59 UI au mg (16.430 UI au total). Le précipité à 55 % d'alcool pesait 60 mg pour 165 UI au mg (soit 9.900 UI au total). Enfin le précipité hormonal pesait 180 mg et titrait 2.400 UI au mg, soit 432.000 UI au total ou 17.500 UI extraites par litre d'urine (rendement 87,5 %).

Cet enchaînement était, donc parfaitement réalisable. Suivant les circonstances, on pouvait ainsi employer indifféremment cette méthode ou détacher les deux extractions, lorsque, par exemple, un contrôle biologique de chaque stade s'avérait nécessaire.

Dans le Tableau X sont rassemblés quelques résultats correspondant à l'extraction hydroalcoolique à partir de P (ou d'un extrait acétonique).

Ainsi la purification est sensible, les pertes d'Unités, en quelque sorte proportionnelles à l'augmentation d'activité spécifique, ne dépassant jamais 20 %.

De titre voisin de 2.000 UI au mg, l'hormone se présentait comme une poudre blanche.

VI. PRÉCIPITATION AU POINT ISOÉLECTRIQUE

Parfaitement soluble dans l'eau, cette dernière préparation devait permettre d'employer une méthode de fractionnement plus fine : la précipitation alcoolique fractionnée, l'hormone précipitant à 60 % d'alcool en milieu acide (au voisinage du point isoélectrique).

Le pH optimum de précipitation devait d'ailleurs être précisé par l'essai que résume le Tableau XI.

TABLEAU XI

Détermination du pH acide le plus favorable à un fractionnement hydroalcoolique.

Produit initial			pH de précipitation	Précipité à 60 % d'alcool		
Poids (mg)	UI/mg	UI (total)		Poids (mg)	UI/mg	UI (total)
100	685	68.500	6,2 (eau)	58,5	800	46.800
100	685	68.500	4,5 (acétate)	55	1.100	60.500
100	685	68.500	3 (ac. acét.)	67	1.020	68.340

Cet essai était nettement en faveur du pH 3 (qui est d'ailleurs le point isoélectrique de l'hormone) : par rapport au pH 4,5, la précipitation était beaucoup plus importante pour un titre identique.

La technique suivante fut donc appliquée :

L'hormone provenant du stade précédent (extraction à 50 % d'alcool à pH 4,5 en présence de Cl_2Ca , et précipitation par 80 % d'alcool) est reprise par une solution diluée d'acide acétique ajustée à pH 3, à une concentration de 1,5 %, à froid. On ajoute alors un volume et demi d'alcool absolu froid, puis on laisse une nuit en glacière. Le lendemain matin, le précipité est centrifugé, lavé, séché, cependant que le surnageant limpide est ajusté à pH 4,5 et amené à 85 % d'alcool : le précipité qui se produit alors est pratiquement inactif.

On peut se demander pourquoi, au stade précédent, au lieu de précipiter l'hormone à 80 % d'alcool, on ne l'a pas précipitée à 60 %, après avoir ramené le pH de 4,5 à 3.

Des essais qui furent tentés dans ce sens, se soldèrent par un échec. Précisons tout d'abord qu'étant en milieu tamponné à pH 4,5, il était assez difficile de redescendre à pH 3 ; de plus, toutes les mesures de pH étaient effectuées au pHmètre, avec l'électrode de verre : or, à 50 % d'alcool, les valeurs données par l'appareil ne correspondent pas au pH de la solution aqueuse, elles sont régulièrement plus élevées. Ainsi le tampon de pH 4,5 dans 50 % d'alcool donne une lecture au pHmètre de 5,8. D'où une difficulté supplémentaire pour se ramener à un pH exact.

Ajoutons que l'extrait alcoolique à 50 % est plus dilué que la solution effectuée spécialement en vue de la précipitation à 60 %. Cette dilution plus grande peut contrarier une précipitation par un pourcentage d'alcool relativement faible.

On trouvera dans le Tableau XII quelques exemples de cette précipitation au point isoélectrique de l'hormone.

TABLEAU XII

Exemples de précipitations au point isoélectrique.

Produit initial			Précipité à 60 % d'alcool-pH 3			Précipité à 85 % d'alcool-pH 4,5		
Poids (mg)	UI/mg	UI (total)	Poids (mg)	UI/mg	UI (total)	Poids (mg)	UI/mg	UI (total)
30	1.800	54.000	17	3.000	51.000	8	336	2.700
90	2.000	180.000	46	3.700	170.000	33	300	9.900
336	1.800	571.000	136	3.800	517.000	145	150	21.750
416	1.900	790.000	204	3.600	734.000	176	215	35.500
300	1.650	501.000	192	2.580	495.000	80		
5.700	1.200	6.840.000	3.520	1.840	6.476.000	1.680		
660	1.120	739.200	362	1.760	637.000	230	100	23.000

Ainsi, par des moyens relativement simples, la progression de l'activité spécifique se poursuivait sans pertes notables.

VII. — ADSORPTION SUR KAOLIN

Après avoir utilisé des extractions ou des précipitations fractionnées, il parut opportun de faire appel à une méthode de purification très différente : une deuxième adsorption que l'on croisait ainsi avec l'adsorption benzoïque initiale, espérant que le facteur commun essentiel de ces deux adsorptions serait l'hormone. Souvent employé dans le cas des gonadotropines de l'urine normale, mais beaucoup plus rarement utilisé pour l'hormone chorale, le kaolin fut choisi.

L'originalité de son emploi, dans le cas présent, résidait dans le fait que cette technique était appliquée à une hormone déjà purifiée, alors que les méthodes précédentes adsorbaient l'activité gonadotrope à partir de l'urine elle-même (SCOTT 1941, LORAINE et coll. 1954) [84].

Ainsi, des adsorptions de l'hormone furent-elles tentées dans l'urine, utilisant le kaolin au lieu de l'acide benzoïque : sur un plan strictement pratique, elles s'avéraient beaucoup plus laborieuses que l'adsorption benzoïque. Le kaolin devait être récupéré par centrifugation, ce qui, pour des extractions importantes, présentait des difficultés matérielles non négligeables. Il devait être lavé plusieurs fois, avant d'être élué ; l'éluat obtenu, devait être précipité, centrifugé à nouveau. Au total, plus d'opérations, plus longues que dans l'adsorption benzoïque, pour arriver finalement à une hormone brute qui n'était pas supérieure.

Ces difficultés n'intervenaient plus à un stade de purification avancé, la technique suivante fut donc appliquée : le kaolin (produit commercial lavé) était traité par cinq volumes d'HCl N, lavé à l'eau distillée, chaque lavage étant accompagné d'une agitation mécanique suffisamment importante pour remettre complètement le kaolin en suspension. On laissait, entre chaque lavage, sédimenter librement, ceci permettant d'éliminer par décantation les particules trop fines.

Les lavages étaient poursuivis jusqu'à ce que la suspension ait un pH de 4,5. On centrifugeait alors le kaolin qui était ensuite repris par un volume tel de tampon acétate de pH 4,5, M/100, que la concentration du kaolin soit de 20 % (rapport poids/volume). La suspension était prête à l'utilisation. Elle pouvait se conserver en chambre froide pendant plusieurs semaines.

LORAINE (1954) [85] a établi des courbes de récupération de gonadotropine par adsorption sur kaolin, en fonction du pH de l'urine : pour H.C., aucune différence sensible n'avait été mise en évidence entre pH 3,5 et pH 5. Le pH 4,5 fut choisi : le rendement de nos adsorptions fut toujours suffisamment élevé pour qu'il ne nous parut pas utile de le modifier.

Le produit hormonal, provenant de la précipitation au point isoélectrique à 60 % d'alcool, était redissous dans x ml de tampon acétate de pH 4,5, M/100, à

une concentration de 20 mg par millilitre. La dissolution était toujours excellente, donnant une solution à peine colorée.

On ajoutait 5 x ml de la suspension de kaolin à 20 % préparée comme il a été indiqué ci-dessus. On agitait une demi-heure, puis on laissait une nuit en glacière. Le lendemain matin, on centrifugeait le kaolin ; le surnageant légèrement trouble était éliminé.

Suivait un lavage du kaolin par un volume 5 x ml de tampon acétate de pH 4,5, M/100. Contrairement à l'adsorption directe dans l'urine, qui nécessitait au moins cinq lavages successifs, un seul suffisait. Après centrifugation, l'eau de lavage était éliminée.

L'éluion était effectuée par une solution ammoniacale de pH 11,5. (En accord avec LORAINÉ, nous avions constaté qu'un pH supérieur à 10 était nécessaire pour obtenir une éluion quantitative.)

On éluait deux fois : tout d'abord en remettant en suspension le kaolin dans 4 x ml de la solution ammoniacale. On centrifugeait, le surnageant était soigneusement prélevé, et le culot à nouveau remis en suspension dans 2 x ml. Après une nouvelle centrifugation, le deuxième surnageant était réuni au premier, et le culot de kaolin écarté. L'éluat était parfois très trouble, contenant en suspension une certaine quantité de particules de kaolin, dont il fallait le débarrasser. Dans ce but, on ramenait le pH de l'éluat à 8,6 par l'acide acétique. Un précipité se formait alors, qui sédimentait en deux heures à froid, laissant après centrifugation une solution surnageante parfaitement limpide et légèrement colorée.

Le pH de cette solution était amené à 4,5-5, par l'acide acétique, puis on précipitait l'hormone par cinq volumes d'acétone. Le lendemain matin le précipité obtenu était lavé et séché selon le processus habituel. C'était l'adsorbat kaolin dont le Tableau XIII donne quelques exemples.

TABLEAU XIII

Exemples d'adsorptions sur kaolin.

Produit initial			Surnageant du Kaolin			Adsorbat Kaolin		
Poids (mg)	UI/mg	UI (total)	Poids (mg)	UI/mg (mg)	UI (total)	Poids (mg)	UI/mg	UI (total)
20	2.000	40.000	8	450	3.600	10	3.700	37.000
154	2.920	450.000	74	500	37.000	79	5.200	410.000
2.400	1.900	4.560.000			210.000	1.130	3.650	4.125.000
178	2.580	459.240				109	4.000	436.000
3.500	1.840	6.440.000				1.730	3.450	5.970.000
116	1.440	167.000	34			70	2.220	155.400
800	1.260	1.008.000				275	3 520	968 000

Une hormone titrant 3.500 à 4.000 UI au mg était ainsi obtenue. L'électrophorèse selon TISELIUS mettait en évidence, dès ce stade, un constituant majeur sur lequel se localisait l'activité, comme le montrait l'électrophorèse sur papier (voir chapitre électrophorèse).

Ainsi l'hormone se précisait, bien qu'elle contint encore un fort pourcentage d'impuretés.

VIII. — CHROMATOGRAPHIE SUR ÉCHANGEUR D'IONS

Il fallait donc poursuivre la purification. KATZMAN, en 1943, avait utilisé avec un certain succès une adsorption de l'hormone sur Permutite. Bien que la chromatographie des protéines sur échangeurs d'ions n'ait pas encore atteint un grand développement, un essai pouvait être tenté. Si l'échangeur choisi, le Décalso, était de la même famille que la Permutite, la chromatographie était effectuée, ici, sur une hormone ayant atteint un haut degré de pureté, alors que les adsorptions précédentes se pratiquaient à partir de l'urine.

Le Décalso est un silicate synthétique de sodium et d'aluminium. Celui qui fut utilisé était le Décalso Y, la lettre Y donnant une indication sur la grosseur des grains : 5 à 50 « mesh ». Les grains blanc-jaunâtres étaient broyés, puis tamisés au tamis 80 « mesh », ceci afin d'éliminer les particules trop fines qui auraient pro-

voqué un écoulement trop lent à travers les colonnes. La poudre ainsi obtenue était lavée à l'eau distillée dans un bécher, l'eau de lavage étant éliminée par décantation. On répétait ces lavages jusqu'à obtention d'un liquide surnageant limpide.

L'adsorbant pouvait alors subir le cycle classique des échangeurs d'ions. Un traitement alcalin par la soude normale (10 volumes) était suivi d'un lavage abondant à l'eau distillée, jusqu'à obtention d'un pH inférieur à 9.

On passait alors au traitement acide : primitivement, l'acide acétique normal était utilisé. Toutefois, l'acide normal dissolvait le Décalso, en entraînant une perte importante. Aussi une acidité plus faible fut-elle adoptée après essais : l'acide acétique N/4 donna des résultats identiques, pour des pertes réduites de Décalso.

Un nouveau lavage à l'eau distillée, jusqu'à un pH égal à 5,5, était pratiqué, et l'on terminait en reprenant le Décalso par un tampon acétate de sodium-acide acétique M/20, de pH 5,5, pour le mettre en colonne, le lavage par le tampon étant poursuivi sur la colonne jusqu'à ce que le pH de l'effluent soit constant et égal à 5,5.

Les dimensions des colonnes étaient évidemment en rapport avec la quantité d'hormone à traiter. Toutefois leur longueur devait être limitée : en effet, devant l'instabilité connue et confirmée de l'hormone chorale en solution aqueuse, craignant de plus une action néfaste d'un contact prolongé avec l'adsorbant, il nous parut indispensable d'effectuer en une journée toutes les opérations, adsorption, élution, précipitation de l'hormone à partir de l'éluat. En général, nos colonnes avaient 3 cm de diamètre, pour une hauteur de 20 cm. Ces colonnes suffisaient pour 250 mg d'hormone titrant 4.000 UI au milligramme, soit 1.000.000 d'unités. On multipliait le nombre des colonnes lorsque des quantités plus importantes devaient être traitées.

Un essai, tenté avec une colonne de 45 × 3 cm, confirma cette hypothèse par son bilan défavorable : 225 mg d'un produit titrant 4.000 UI au milligramme furent obtenus à partir de 500 mg à 3.500 UI au milligramme.

C'est également la crainte d'une dénaturation, provoquée par le Décalso en milieu acide, qui nous fit choisir un pH d'adsorption aussi proche de la neutralité que le tampon acétate le permettait. En effet, un premier essai à pH 3,6 fut franchement défavorable. Une expérience comparative à trois pH, 4,5, 5 et 5,5 fut assez nettement en faveur du pH 5,5, ainsi qu'en témoignent les résultats groupés dans le Tableau XIV.

TABLEAU XIV

Détermination d'un pH optimum d'adsorption sur Décalso.

Dimensions la colonne de	Hormone mise sur la colonne			pH de la colonne	UI dans l'effluent	UI dans l'éluat
	Poids (mg)	UI/mg	UI totales			
18 × 0,8 cm	10	3.700	37.000	4,5	1.800	29.000
—	—	—	—	5	1.500	32.000
—	—	—	—	5,5	1.800	34.000

Dans les conditions décrites, l'hormone s'adsorbait sur la colonne, une partie des impuretés inactives passait dans l'effluent.

Le déplacement de l'hormone devait être effectué par une solution saline de force ionique élevée, de pH proche de la neutralité pour éviter une dénaturation possible à un pH alcalin, en présence d'une certaine concentration en alcool qui diminuait la quantité de protéines étrangères éluées avec l'hormone. On devait réaliser une élution quantitative par l'acétate d'ammonium à 10 % dans l'alcool à 40 %. Restait accrochée sur le Décalso une fraction importante d'impuretés inactives que la soude normale déplaçait.

L'hormone à purifier était dissoute dans le volume minimum de tampon acétate M/20 pH 5,5. La solution ainsi obtenue était déposée sur la colonne, en prenant soin de ne pas perturber la surface de l'adsorbant. Après pénétration, un volume plus important de tampon était ajouté. A la sortie de la colonne, des fractions effluentes égales étaient recueillies à l'aide d'un collecteur de fractions, leur volume et le débit étant fonction des dimensions de la colonne (15 ml par fraction, 1 ml à la minute, pour des colonnes de 3 × 20 cm). La concentration en protéine de chaque fraction était déterminée par mesure spectrophotométrique à 278 mμ.

Aussitôt après le « hold-up » de la colonne, des protéines, biologiquement inactives, apparaissaient dans l'effluent. Dès que leur concentration tendait vers zéro, on commençait l'élution, en remplaçant le tampon par la solution hydro-alcoolique d'acétate d'ammonium.

On réunissait les fractions ayant une concentration protéique suffisante, négligeant les fractions de fin d'élution. Le degré alcoolique de l'éluat ainsi constitué était amené à 80. On laissait une nuit en glacière.

Notons que l'ensemble des opérations, jusqu'à la précipitation de l'hormone, avait été effectué en une journée.

Le lendemain matin, le précipité était centrifugé, lavé, séché : c'était une poudre blanche dont le titre variait entre 7.000 et 9.000 UI en mg. Le Tableau XV donne quelques exemples de cette chromatographie sur Décalso.

TABLEAU XV

Exemples de chromatographies sur colonne de Décalso.

Colonnes		Produit mis sur la colonne			Précipité obtenu à partir de l'éluat		
Nombre	Dimens. (cm)	Poids (mg)	UI/mg	UI (total)	Poids (mg)	UI/mg	UI (total)
1	17 × 2	50	3.650	182.500	26	7.000	182.000
1	45 × 3	500	3.450	1.725.000	225	4.000	900.000
1	17 × 2	30	4.000	120.000	17	7.000	119.000
4	18 × 3	600	3.450	2.070.000	332	7.500	2.490.000
4	18 × 3	600	3.450	2.070.000	365	7.000	2.355.000
1	19 × 3	230	3.650	839.500	113	8.550	966.150
1	17 × 3	205	3.650	748.500	110	7.800	858.000
1	19 × 3	170	3.520	598.400	92	7.000	644.000

Si l'on excepte l'essai signalé plus haut, utilisant une colonne de 45 cm de long, le produit obtenu titrait au moins 7.000 UI au milligramme, parfois près de 9.000 UI/mg.

Une particularité doit être signalée : les colonnes 5 et 8 du Tableau XV mettent en évidence un rendement souvent supérieur à 100 %.

Ceci ne peut être imputé à des erreurs de dosage physiologique, pas plus qu'à son imprécision relative. En effet, devant ce gain imprévu, certaines hormones ont été titrées systématiquement plusieurs fois, contre le standard international, avec un nombre élevé d'animaux : ce résultat a toujours été confirmé.

Nous obtenions ainsi une hormone de titre élevé, cependant l'électrophorèse en veine liquide nous montra qu'il subsistait quelques impuretés, en faible proportion, certes, non décelables par électrophorèse sur papier, mais nettement apparentes sur les clichés de l'appareil de Tiselius. L'électrophorèse de zone sur amidon confirma cette contamination (voir chapitre électrophorèse).

Il fallait donc un stade supplémentaire si nous voulions posséder une hormone répondant parfaitement aux critères de pureté des protéines, ce qui était en fait le but de cette préparation.

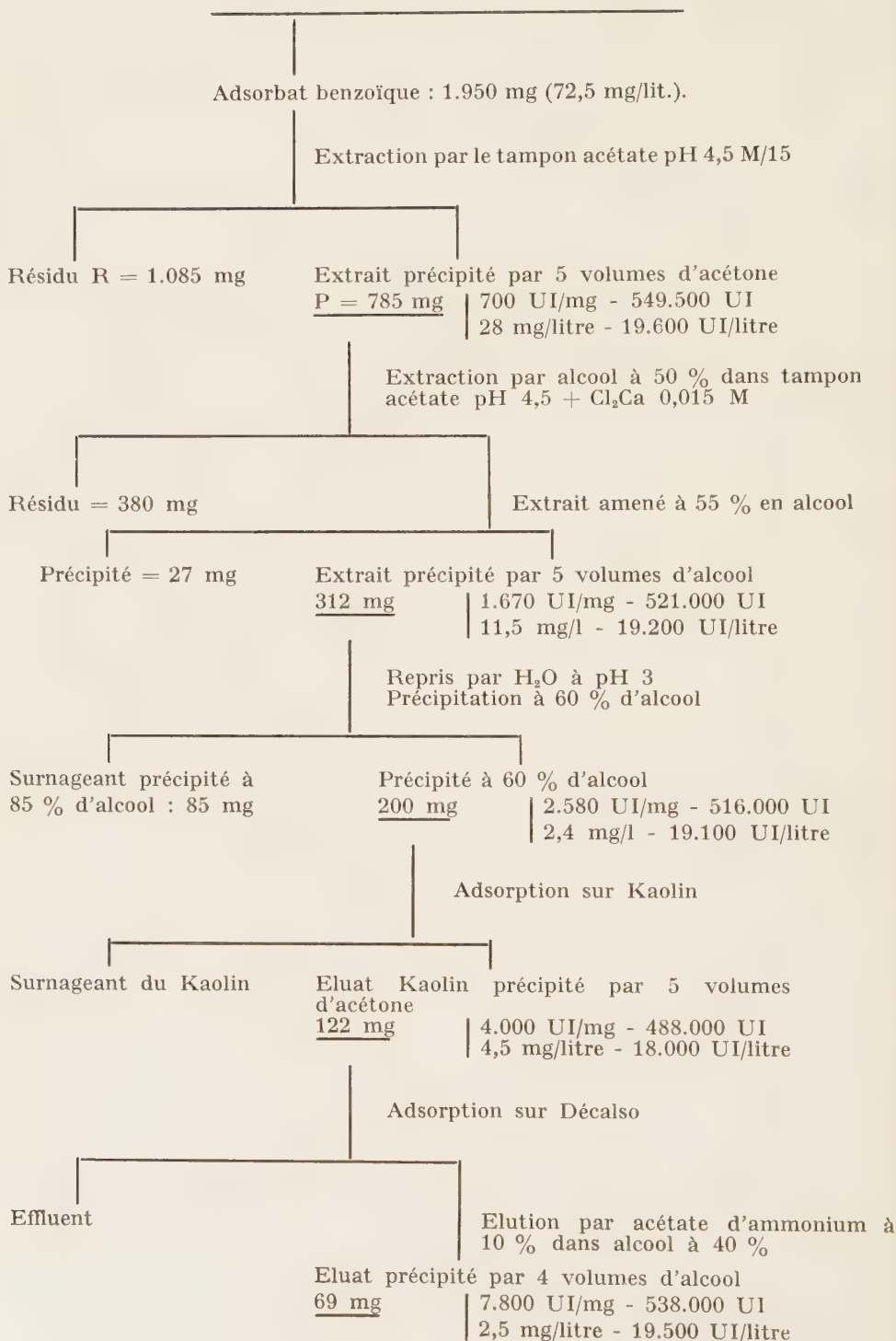
Avant de passer à cette ultime étape, nous donnerons un schéma de ce que l'on peut appeler la préparation de l'hormone, la dernière phase étant la purification.

Deux exemples caractéristiques seront ainsi présentés : l'un mettant en jeu de faibles quantités (27 litres) d'une urine assez riche : 23.000 UI/litre, — l'autre ayant pour point de départ 1.050 litres d'une urine titrant seulement 8.500 UI/litre.

Quelle que soit la dissemblance de leur point de départ, ces deux préparations aboutissent à un produit final sensiblement identique.

Pourtant, dans la préparation I — faible volume d'une urine relativement riche, — le premier précipité P titrait 700 UI/mg pour 28 mg/litre, alors que dans la préparation II — volume important d'une urine pauvre en activité — le même précipité P titrait 135 UI/mg pour 58 mg/litre.

**Schéma d'une préparation portant sur
27 litres d'urine titrant 23.000 UI/litre
(621.000 UI)**



**Schéma d'une préparation portant sur
1.050 litres d'urine titrant 8.500 UI/lit.
(8.925.000 UI)**

Adsorbat benzoïque

Extraction par le tampon acétate pH 4,5 M/15

Résidu R = 273.000 mg

Extrait précipité par 5 volumes d'acétone
P = 60.000 mg | 135 UI/mg - 8.100.000 UI
| 57 mg/litre - 7.100 UI/litre

Extraction par alcool à 50 % dans tampon
acétate pH 4,5 + Cl_2Ca 0,015 M

Résidu = 52.000 mg

Extrait amené à 55 % en alcool

Précipité : 825 mg

Extrait précipité par 5 volumes d'alcool
5.760 mg | 1.200 UI/mg - 6.912.000 UI
| 5,5 mg/litre - 6.600 UI/litre

Repris par H_2O à pH 3
Précipitation à 60 % d'alcool

Surnageant précipité à
85 % d'alcool : 1.700 mg

Précipité à 60 % d'alcool
3.675 mg | 1.840 UI/mg - 6.782.000 UI
| 3,5 mg/litre - 6.440 UI/litre

Adsorption sur Kaolin

Surnageant du Kaolin

Eluat Kaolin précipité par 5 volumes
d'acétone
1.785 mg | 3.450 UI/mg - 6.158.250 UI
| 1,7 mg/litre - 5.865 UI/litre

Adsorption sur Décalso

Effluent

Elution par acétate d'ammonium à
10 % dans alcool à 40 %

Eluat précipité par 4 volumes d'alcool
988 mg | 7.000 UI/mg - 6.916.000 UI
| 0,94 mg/litre - 6.580 UI/litre

PURIFICATION

Les impuretés, qui subsistaient après le passage sur Décalso, étaient en faible proportion : on pouvait supposer qu'il serait aisé de les éliminer. Cependant il importait d'opérer cette purification avec un rendement maximum, car les pertes éventuelles, intervenant sur un produit hautement purifié, seraient très sensibles.

DEUXIÈME CHROMATOGRAPHIE SUR DECALSO

Le résultat excellent, obtenu par la chromatographie sur Décalso, nous encouragea à effectuer une deuxième adsorption dans des conditions absolument identiques à la première.

Ainsi, partant d'une hormone titrant 7.000 UI au mg, l'activité spécifique put être amenée au-delà de 10.000 UI au mg. Il faut cependant signaler que lors de ce deuxième passage, le rendement resta inférieur à l'unité.

CHROMATOGRAPHIE SUR DOWEX 2

Ce succès renouvelé de l'utilisation du Décalso nous incita à essayer un autre adsorbant, fréquemment employé dans la chromatographie des protéines : le Dowex 2 (BOMAN et WESTLUND 1956) [87].

Cet échangeur d'anions est un ammonium quaternaire établi sur un squelette de polystyrène. Avant usage, on lui faisait subir le traitement suivant : de faible granulométrie (200 à 400 « mesh »), les particules trop fines du produit commercial étaient éliminées par lavage avec deux volumes d'eau dans un bécher, la suspension étant décantée après sédimentation.

Le cycle habituel des résines se bornait à un lavage par l'acide chlorhydrique normal : on éliminait ainsi une impureté qui réagissait avec HCl en donnant un dégagement gazeux. D'ailleurs, après chaque usage, la résine était régénérée par un lavage avec HCl N, qui semblait enlever toutes les protéines restant adsorbées. Par un lavage à l'eau, on éliminait l'acide chlorhydrique, on mettait en colonne, et on poursuivait le lavage jusqu'à un pH de l'ordre de 3,8 dans l'effluent. La colonne était alors équilibrée à pH 7,3 par le tampon tris (hydroxyméthyl) aminométhane — acide chlorhydrique recommandé par GOMORI (1946) [88] (un litre de solution stock M du tampon était obtenu en dissolvant 121 g de « Tris » dans 700 ml d'eau ; HCl concentré était ajouté — environ 70 ml — jusqu'à pH 7,3 et le volume était ajusté à un litre).

Après passage d'une quantité de tampon 0,25 M, égale au volume mort de la colonne, on terminait par six à huit fois le même volume de tampon 0,04 M.

Les colonnes étaient de dimensions plus restreintes que celles du Décalso : 2×25 cm pour 100 mg de produit. L'écoulement étant très lent, il importait de réduire le volume mort afin que, là encore, toutes les opérations puissent s'exécuter en une journée.

L'hormone, dissoute dans le tampon « Tris » 0,04 M, était déposée sur la colonne, la chromatographie s'effectuant ainsi à faible force ionique. Dans ces conditions, on retrouvait l'activité directement dans l'effluent, les substances inactives restant accrochées. (On pouvait d'ailleurs les éluer en augmentant la molarité du tampon : 0,25 M.)

Après détermination de leur teneur en protéine (par lecture spectrophotométrique à 278 $m\mu$ contre l'eau), les fractions les plus concentrées de l'effluent étaient réunies et précipitées par 5 volumes d'alcool. On obtenait ainsi un précipité titrant 10.000 à 12.000 UI au milligramme.

Le fait de retrouver l'hormone directement dans l'effluent était évidemment un avantage. Toutefois, il semble bien que cette chromatographie n'atteignait toute son efficacité que si l'on partait d'un produit hautement purifié. Ainsi cette méthode n'aurait pu remplacer le premier passage sur Décalso.

Le Tableau XVI donne quelques exemples de ces ultimes purifications.

TABLEAU XVI

Exemples de purification par chromatographie sur colonne de Dowex ou de Décalso.

Résine	Dimension de la colonne	Produit de départ			Hormone finale		
		Poids (mg)	UI/mg	UI (total)	Poids (mg)	UI/mg	UI (total)
Décalso	10 × 1,5 cm	26	7.000	182.000	14,5	10.500	152.200
—	21 × 3 —	140	7.500	1.050.000	83	12.000	996.000
Dowex	25 × 1 —	15	8.000	120.000	9,5	12.000	114.000
—	24 × 2 —	100	8.550	855.000	78	10.300	803.400

ELECTROPHORÈSE DE ZONE SUR AMIDON

Une autre méthode de purification, différente dans son principe des deux premières, fut également utilisée : l'électrophorèse de zone sur amidon.

On trouvera au chapitre électrophorèse, l'exposé détaillé de cette technique et des résultats obtenus, dont on signalera simplement ici l'identité avec les précédents.

Une méthode d'isolement et de purification a été établie, permettant d'obtenir, à partir d'urines d'activités variables, une hormone d'un titre jamais atteint à ce jour. Mettant en jeu des adsorptions croisées, des extractions aqueuses ou hydro-alcooliques en présence de cations métalliques, une précipitation fractionnée au point isoélectrique, une chromatographie sur adsorbant, terminée en son ultime stade de purification, soit par de nouvelles chromatographies sur échangeurs d'ions, soit par électrophorèse de zone sur amidon, cette méthode nous a régulièrement conduits à une hormone titrant 10.000 à 12.000 UI au milligramme.

Le résultat espéré était ainsi obtenu par ces différentes voies : une hormone dont la pureté devait être confirmée par plusieurs critères, justiciable, par suite, d'une étude physique et chimique.

Tous les résultats consignés dans ce travail ont été déterminés sur ce produit final.

ÉTUDE ÉLECTROPHORÉTIQUE

Si le test biologique, véritable fil d'Ariane, fut notre guide au cours de la préparation, grâce à la détermination qu'il permettait de l'activité spécifique, très tôt l'électrophorèse intervint.

Qu'elle soit en veine liquide ou sur support solide, moyen d'analyse ou procédé de purification, méthode de mesure physique ou critère d'homogénéité, l'électrophorèse participa activement à la préparation de l'hormone, à la vérification de sa pureté, à l'étude physique du produit final.

I. — ELECTROPHORÈSE SUR PAPIER

Aussitôt que fut obtenu un produit hormonal titrant 1.000 UI au milligramme⁹ il parut intéressant de déterminer son comportement électrophorétique : c'est évidemment à l'électrophorèse sur papier que l'on s'adressa.

Avant nous, MICHL, RIEDL et WESSELY (1951) [89], avec une préparation selon KATZMAN (1943) [90], obtenaient par cette technique deux fractions protéiques, lesquelles, toutefois, n'avaient pas été dosées. DUSTIN, WODON, MERARD et BIGWOOD (1952) [91] montraient par la même méthode la présence de deux constituants à partir d'une fraction obtenue sur filtre Chamberlain : seul le constituant rapide était doué d'activité. Plus récemment STRAN et SEEGAR-JONES (1954) [92], ayant isolé l'hormone par la méthode au Kaolin, trouvent une activité gonadotrope à la fois dans les compartiments anodique et cathodique. Enfin SCHNEIDER et BIRTEL (1955) [93], par électrophorèse sur papier à pH 5,8 dans le tampon véronal, mettaient en évidence des fractions amino-stéroïdes (des essais, effectués dans ce sens, ne permirent pas de retrouver ces résultats).

Méthode simple, rapide, peu coûteuse en produit, répondant parfaitement à nos premières exigences, l'électrophorèse sur papier fut utilisée à tous les stades de préparation. Une étude comparative des diagrammes électrophorétiques et biologiques de différentes fractions obtenues au cours de la préparation, nous permit d'ailleurs d'apporter un élément nouveau sur l'état physico-chimique de la gonadotrophine chorale dans l'urine (BOURILLON et GOT 1956) [94].

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

Huit cents μ g de la préparation étudiée étaient soumis à la migration électrophorétique dans l'appareil Elphor H, à pH 8,6 dans le tampon véronal sodique de Michaëlis, de force ionique 0,1, pendant 15 heures à la température ambiante sous 110 volts.

Les protéines étaient révélées, après séchage de la bande à 100°C pendant 15 minutes, par l'Amidoschwarz 10 B. La concentration en protéine était mesurée par lecture photométrique.

Lorsque l'on voulait déterminer la répartition de l'activité physiologique, deux électrophorèses du même produit étaient effectuées simultanément dans une même cuve. Une des bandes servait alors à tracer la courbe de concentration des protéines. Sur l'autre, une section longitudinale, large d'un demi-centimètre, était prélevée et révélée à l'Amidoschwarz, permettant ainsi un repérage précis de la position des frontières.

Après séchage à la température ambiante, le reste de la bande était découpé, perpendiculairement à l'axe de migration, en segments dont la largeur variait de 0,15 cm à 0,5 cm, selon le degré de pureté de la préparation étudiée. Ces segments étaient élués par du sérum physiologique, durant quelques heures, en glacière. Après quoi, un prélèvement d'un volume déterminé était effectué sur chaque fraction, séché sous vide, puis testé pour son activité physiologique. Chaque segment étant dosé sur quatre à six animaux, une courbe pouvait être tracée en correspondance avec la courbe de protéine.

L'électrophorèse durait une nuit, le découpage et l'éluion la matinée suivante, l'ensemble des opérations portant sur une vingtaine d'heures, ceci afin d'éviter des pertes d'activité trop importantes dues à l'instabilité de l'hormone en solution.

RÉSULTATS

Les produits étudiés par ce procédé permettant de mettre en parallèle l'activité biologique et le diagramme électrophorétique, titraient respectivement 1.000 UI/mg, 2.500 UI/mg, 6.000 UI/mg et 10.000 UI/mg. La figure 2 met en évidence le caractère hétérogène d'une préparation peu active (1.000 UI/mg), dans

laquelle se précisent deux bandes protéiques nettement distinctes, révélables par l'Amidoschwarz, migrant vers l'anode, la plus lente étant la plus intense.

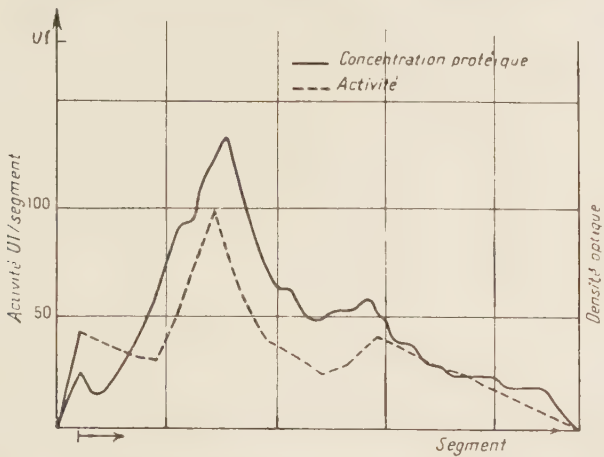


Fig. 2. — Diagramme électrophorétique réalisé sur papier, d'une préparation titrant 1.000 UI/mg. L'activité biologique (traits pointillés) étalée est répartie sur plusieurs frontières protéiques.

L'activité de cet ensemble protéique n'est pas moins complexe. On note, en effet, la présence de deux composés actifs correspondant aux deux bandes protéiques, avec, en outre, plusieurs constituants assez mal délimités, mais biologiquement actifs.

Dans une expérience réalisée avec une préparation titrant 1.250 UI/mg, nous avons découpé la bande de papier, après migration, en trois fractions correspondant aux deux frontières protéiques, et à la plage libre de protéines les séparant. Les résultats obtenus montraient nettement la présence de deux composés distincts :

Frontière lente	800 UI
Plage non protéique	6 UI
Frontière rapide.....	250 UI

Donc à ce stade de purification, le résultat essentiel est le caractère multiple des protéines urinaires douées d'activité gonadotrope, avec un constituant principal de faible mobilité.

Bien différent se présente le diagramme protéique d'une fraction plus purifiée (2.500 UI/mg) (fig. 3). Il est, en effet, moins complexe, le constituant protéique rapide a disparu. Il n'y a qu'une bande protéique, mais sa largeur, son asymétrie témoignent de son caractère hétérogène.

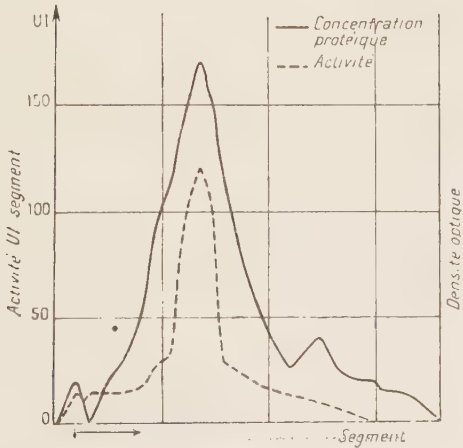


Fig. 3. — Diagramme électrophorétique réalisé sur papier, d'une préparation titrant 2.500 UI/mg. Activité biologique (traits pointillés) étalée, mais sur une seule frontière.

Cette bande a été découpée en quatorze fractions de 0,25 cm de large. On constate que la courbe d'activité biologique s'inscrit dans l'aire de la courbe protéique, mais il n'est pas possible d'identifier nettement deux ou plusieurs constituants biologiques ; l'existence d'épaulement indique la présence de fractions secondaires. Nous devons souligner que la disparition du composé rapide n'est pas suivi de la perte d'activité biologique correspondante. Cette activité, en effet, se retrouve sur la fraction lente dans la préparation à 2.500 UI/mg.

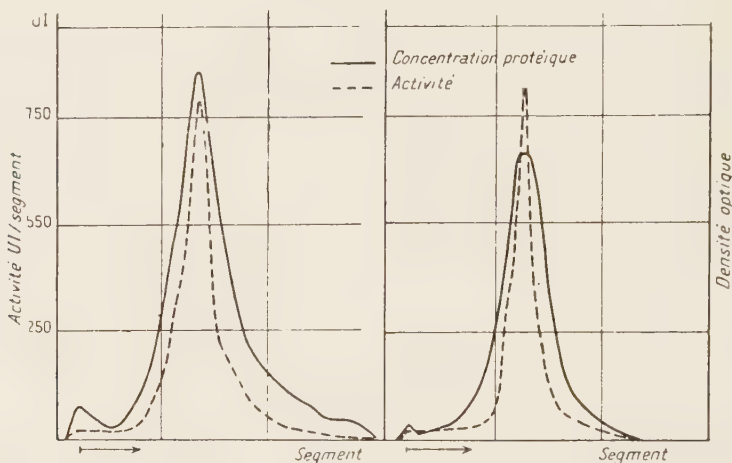


Fig. 4. — Diagrammes électrophorétiques de préparations purifiées titrant 6.000 UI/mg (cliché de gauche) et 10.000 UI/mg (cliché de droite). Courbe d'activité biologique très étroite et symétrique, témoignant d'une haute pureté.

Les préparations hautement purifiées, 6.000 et 10.000 UI/mg, présentent des diagrammes presque identiques (fig. 4), la différence résidant dans le fait que la substance à 6.000 UI/mg contient encore des impuretés. Dans les deux cas, cependant, apparaît un pic unique et symétrique dont la base est très étroite, surtout dans le cas de l'hormone à 10.000 UI. Des segments de 0,2 cm (6.000 UI) et 0,15 cm (10.000 UI) de large ont été découpés (13 fractions).

La courbe d'activité biologique, elle aussi parfaitement symétrique, ne laisse pas de place à la possibilité d'un dédoublement de l'activité. Les impuretés situées de part et d'autres du pic, dans la préparation à 6.000 UI, ne possèdent aucune activité biologique sensible.

Ainsi, dès le stade de purification, se situant vers 6.000 UI/mg, peut-on admettre l'individualisation de l'hormone gonadotrope, même si la pureté physique n'est pas encore complète. La purification ultérieure consiste à éliminer quelques impuretés inactives.

L'existence de plusieurs formes actives de l'hormone avait cependant été signalée, mais le plus souvent de façon imprécise. MICHL (1951), DUSTIN (1952), STRAN (1954) [95] trouvaient deux ou plusieurs constituants par l'électrophorèse, mais le pouvoir gonadotrope était soit indéterminé, soit décelé dans le composé rapide, ou encore, dans les deux compartiments anodique et cathodique.

Nos résultats sont opposés aux précédents : d'une part, l'activité migre toujours vers l'anode (à pH 8,6), d'autre part, c'est le composé le plus lent qui est le plus actif. La deuxième frontière disparaît rapidement au cours de la purification, l'activité biologique subsistant intégralement et se retrouvant sur la frontière de faible mobilité. L'unicité de l'hormone est démontrée par la concordance parfaite des courbes d'activité et de concentration protéique, à partir d'un certain stade de purification.

Partant de ces faits, on peut émettre l'hypothèse que la gonadotropine chorale humaine est excrétée dans l'urine sous forme de complexes protéiques labiles, que la purification permet de scinder, pour aboutir à l'isolement d'une hormone homogène et bien individualisée.

11. - ELECTROPHORESE DE ZONE SUR AMIDON

Procédé de purification, ou critère de pureté, le haut pouvoir de résolution de cette méthode lui a donné un développement considérable (RAACKE et LI, 1954, 1955 ; KUNKEL et SLATER, 1952) [96].

RAACKE, LI et LOSTROH (1954) [97] étudièrent par cette technique le comportement de l'hormone chorale : utilisant des préparations de différents stades de pureté, ils conclurent à la présence de deux gonadotropines chorales, qu'ils appelaient H.C.G. A et H.C.G. B.

Les électrophorèses sur colonne d'amidon que nous avons effectuées, soit dans un but préparatif, soit pour vérifier l'homogénéité d'une hormone pure, ont confirmé l'unicité de la frontière protéique active, en désaccord avec les conclusions de RAACKE et coll.

Cette divergence avec les auteurs américains a été discutée ailleurs (BOURRILLON et GOT, 1956) [98] : après un examen approfondi de leurs résultats, il ne semble pas que l'on puisse conclure à l'existence de deux protéines distinctes, douées d'activité biologique.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

L'appareillage utilisé diffère selon les auteurs. Les uns utilisent la migration horizontale dans une augette remplie d'amidon, suivie de découpage du support en sections qui sont ensuite éluées (KUNKEL et coll. 1952, FONSS-BECH et LI 1954, NIKKILA, HAAHTI et PESOLA 1953) [99]. Les auteurs suédois (CARLSON 1954, FLODIN et PORATH 1953) [100] réalisent une électrophorèse en tube vertical, suivie d'une élution, par flux de tampon, des fractions ainsi séparées.

Une étude systématique, que nous avons entreprise (BOURRILLON et GOT 1955) [101] de la méthode d'électrophorèse de zone en milieu d'amidon, nous a conduit à proposer une nouvelle technique d'appareillage.

Parmi les différents supports utilisés, agar, poudre de verre (HAGLUND et TISELIUS 1950, BRADISH 1954) [102], amidon, cette dernière substance, préconisée par KUNKEL et SLATER (1952) [103], semble présenter le plus d'avantages, avec un minimum d'inconvénients.

La technique d'électrophorèse de zone en tube vertical, suivie d'élution, séduisante par sa simplicité, présente le désavantage d'élargir, par un effet de trainée, les frontières qui finissent par empiéter les unes sur les autres.

Par contre, il est aisé de remplir de façon homogène un tube dans lequel la sédimentation se fait sans gêne, plus qu'une augette où il est difficile de contrôler la consistance du support amidon.

D'autre part, l'évaporation au cours de la migration, importante sur la grande surface de l'augette, est pratiquement nulle dans le cas du tube vertical.

En outre, la mise en place de la solution protéique, simple dans ce dernier cas, est plus laborieuse quand on doit prélever un petit bloc d'amidon pour le remplacer par le volume de la solution à analyser.

Au contraire, la méthode de découpage présente sur celle de l'élution, l'avantage de saisir les frontières séparées, exactement dans l'état où elles se trouvent à la fin de la migration.

Aussi avons-nous cherché à concilier les avantages des deux méthodes : tube vertical et découpage de l'amidon. L'appareillage suivant a été conçu dans ce but : la colonne devant contenir l'amidon est formée de deux demi-cylindres, adaptés l'un à l'autre par deux rebords plans fixés le long des génératrices. Lorsque l'électrophorèse est terminée, il suffit de séparer les deux demi-cylindres, en coupant longitudinalement l'amidon à l'aide d'une spatule. On peut alors découper l'amidon en tranches régulières d'une épaisseur donnée (1 cm à 1,5 cm), comme dans une augette. Cette méthode est, en outre, plus rapide que l'élution.

La colonne d'amidon avait 35 à 40 cm de longueur, pour un diamètre de 3 cm ; ces dimensions permettaient de traiter jusqu'à 300 mg de protéines. Le support était l'amidon de pomme de terre pour électrophorèse (BENDER et HOBEIN A.-G. ZURICH). On éliminait les particules trop fines par lavages répétés, avec un grand volume d'eau, suivis de décantation des particules restant en suspension.

Les électrodes de platines impolarisables étaient situées dans des bacs à deux compartiments communiquant par un siphon rempli de laine de verre, ceci afin de minimiser les variations de pH dues à l'électrolyse. Les électrophorèses étaient effectuées en chambre froide, sous une tension de 400 volts, avec un courant de 10 à 12 mA, durant 45 à 48 heures.

On utilisait le tampon véronal sodique-HCl-acétate de sodium, de pH 8,6, de force ionique 0,05.

La solution d'hormone dans le tampon, aussi concentrée que possible, était déposée sur l'amidon, en évitant de perturber sa surface. On la laissait pénétrer de 12 cm environ, à l'aide d'un flux de tampon. Toutefois, par suite de la faible mobilité de l'hormone, même à ce pH alcalin, un léger recul de la frontière hormonale se produisait au cours de l'électrophorèse, sous l'influence de l'électro-osmose. Il fallait donc une pénétration plus importante de la solution

initiale dans l'amidon. Ceci aurait entraîné un élargissement de la zone de départ, nuisible à la bonne séparation des frontières ; aussi employait-on l'artifice suivant : une colonne d'amidon était confectionnée, d'une hauteur égale à 20-22 cm. On déposait à la surface la solution à analyser, qu'on laissait pénétrer de 1 à 2 cm ; puis on terminait la colonne en ajoutant avec soin une pâte d'amidon aussi peu liquide que possible, de telle sorte que la colonne complète ait environ 40 cm. L'échantillon se trouvait donc au milieu de la colonne sans avoir eu à migrer dans l'amidon.

L'élution des tranches s'obtenait en délayant l'amidon dans quelques millilitres d'eau distillée, puis en filtrant sur verre fritté n° 4 (suffisamment fin pour interdire le passage aux particules d'amidon). Tous les éluats étaient ajustés au même volume (en général 10 ml). La concentration en protéines des fractions était mesurée par la méthode de LOWRY (1951) [104] : cette méthode présente l'avantage d'être très sensible ; et, bien qu'elle ne soit pas spécifique des liaisons polypeptidiques, la relativité de la détermination permet de l'employer. En effet, les substances en cause étant de composition chimique voisine, les erreurs introduites par l'utilisation de ce dosage étaient sans incidence sur une mesure relative. D'ailleurs, le dosage par lecture spectrophotométrique directe à 278 m μ était pratiquement impossible, par suite de l'absorption du tampon véronal dans l'ultra-violet, et le dosage du biuret exigeait beaucoup trop de produit.

L'activité physiologique était testée fraction par fraction — permettant ainsi de tracer la courbe d'activité parallèlement à celle des concentrations protéiques — et sur les précipités alcooliques obtenus à partir des fractions homologues réunies.

RÉSULTATS

Les deux possibilités de cette technique ont été exploitées.

A) Tout d'abord, l'électrophorèse sur amidon permit de préparer l'hormone pure, à partir de produits d'activité spécifique variable, mais toujours supérieure à 3.000 UI/mg. En effet, des essais tentés sur des préparations d'activité spécifique relativement faible — 1.500 à 2.000 UI au milligramme — n'amènèrent pas une purification sensible car, identiquement à l'électrophorèse sur papier, en accord d'ailleurs avec RAACKE et coll. [105], l'activité se répartissait alors sur une zone trop étalée.

Pour que cette méthode de préparation put s'appliquer heureusement, il fallait que l'hormone se précisât en un pic électrophorétique net.

Ainsi la figure 5 représente la courbe de concentration protéique en fonction du nombre des segments d'amidon, pour un produit titrant 3.800 UI/mg. Si les impuretés inactives sont encore présentes en majorité dans un tel produit, l'activité hormonale se retrouve dans un seul clocher : le précipité obtenu à partir des fractions 7 à 11 pesait 70 mg et titrait 10.080 UI au milligramme pour 200 mg d'une substance initiale, titrant 3.800 UI au milligramme.

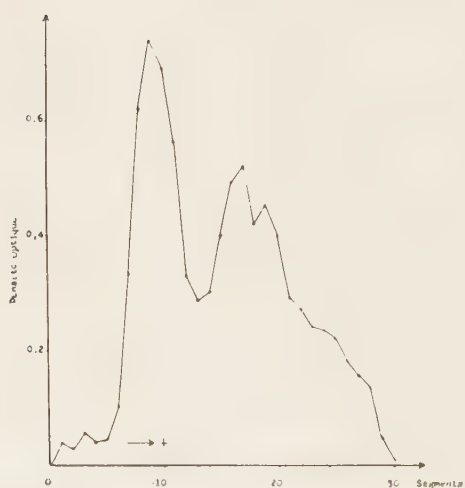


Fig. 5. — Electrophorèse sur amidon d'une préparation titrant 3.800 UI/mg.



Fig. 6. — Electrophorèse sur amidon d'une préparation titrant 7.000 UI/mg.

Dans une hormone titrant 7.000 UI au milligramme, on ne trouve plus que 30 à 35 % d'impuretés inactives. Sur la figure 6 sont tracées parallèlement les courbes de concentration en protéines et d'activité biologique. Le maximum de cette dernière est en parfaite coïncidence avec le pic le plus lent et le plus important qui se trouve être le siège de toute l'activité hormonale.

Dans l'essai que représente la figure 7, c'est encore sur une hormone titrant 7.000 UI au milligramme que l'électrophorèse a été effectuée : la courbe d'activité physiologique n'a pas été tracée mais le précipité obtenu à partir des fractions 3 à 8 montrait seul une activité (11.000 UI/mg), le précipité des fractions 9 à 27 étant totalement inactif.

Ainsi ce procédé physique de préparation s'avérait plus efficace que les moyens chimiques utilisés concurremment : en effet, il permettait d'obtenir l'hormone pure directement à partir d'un produit titrant 4.000 UI au milligramme.

Cependant l'élégance de cette méthode était contrebalancée par sa longueur (la migration seule durait deux jours), sa délicatesse, l'inconstance de son rendement, et le risque toujours possible d'une dénaturation de l'hormone par son trop long séjour en solution aqueuse.

La technique de chromatographie binaire (« tout ou rien »), sur colonne de Décalso ou de Dowex 2, que nous avons décrite précédemment, était au moins plus routinière, faisant appel à un appareillage plus banal et plus simple.

Il n'en reste pas moins que, là où les méthodes chimiques ont échoué, l'électrophorèse de zone peut être un ultime recours.

B) Lorsqu'il s'agit de démontrer et de confirmer la pureté d'une protéine, la nécessité s'impose de plusieurs critères, et l'électrophorèse de zone en est un, excellent, surtout lorsqu'on peut y adjoindre une détermination d'activité physiologique.

Beaucoup plus précise que l'électrophorèse sur papier, l'électrophorèse sur amidon est également plus sensible : son pouvoir de résolution élevé et la quantité de substance qu'elle met en jeu permettent de montrer la présence éventuelle d'impuretés, même en très faible proportion.

Aussi, des électrophorèses ont-elles été effectuées sur des hormones pures, titrant plus de 10.000 UI au milligramme, obtenues par l'un ou l'autre des procédés de purification que nous avons décrits : Décalso, Dowex 2, ou électrophorèse sur amidon.

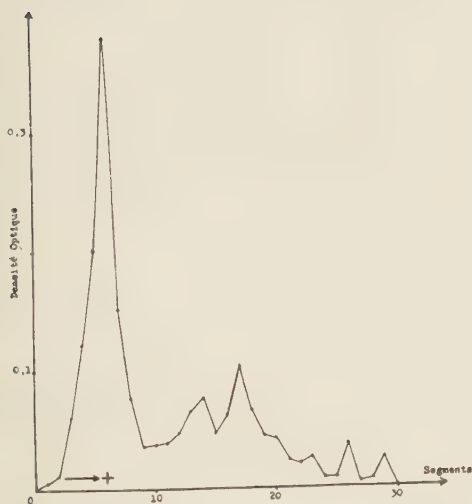


Fig. 7. — Electrophorèse sur amidon d'une préparation titrant 7.000 UI/mg.

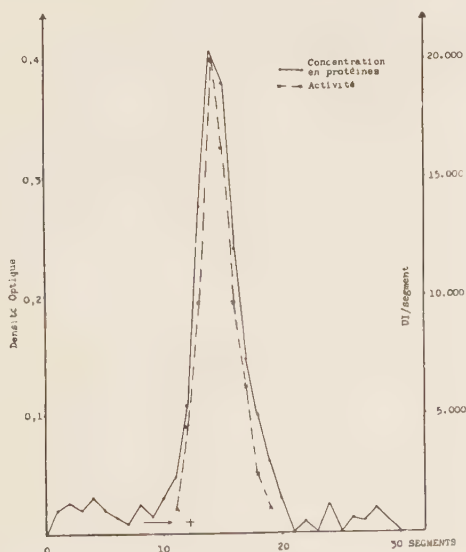


Fig. 8. — Electrophorèse sur amidon d'une préparation titrant 11.000 UI/mg. (Produit final.)

La figure 8 en est un exemple caractéristique : la symétrie du pic et la parfaite concordance, point par point, des courbes de concentration protéique et d'activité biologique sont des preuves de l'homogénéité de l'hormone ainsi testée.

Les irrégularités qui encadrent le clocher sont pratiquement négligeables : les valeurs des densités optiques correspondantes entrent dans les limites de précision du dosage.

Ainsi ce premier test nous permet déjà de prétendre que notre but est atteint ; notre méthode de préparation et de purification nous a conduit à une hormone pure, possédant une activité spécifique jamais atteinte à ce jour à partir d'urines de grossesse normale, et dont l'homogénéité n'a pas été infirmée par une migration de 48 heures, dans une colonne d'amidon.

III. — ÉLECTROPHORÈSE EN VEINE LIQUIDE

Depuis que TISELIUS publia en 1937 [106] un perfectionnement de l'appareillage, l'électrophorèse en veine liquide connaît un succès qui ne s'est pas démenti. Elle est souvent la seule méthode valable pour une analyse quantitative, sinon la plus importante pour l'étude des propriétés électriques des protéines, et leur séparation.

On peut affirmer que le but des principales techniques de préparation antérieures était d'obtenir une substance homogène à l'électrophorèse.

Certains auteurs ont presque atteint ce but ; cependant, les études électrophorétiques entreprises précédemment sont trop incomplètes pour qu'on puisse en tirer une conclusion définitive.

GURIN et coll. (1939, 1940) et LUNDGREN, GURIN, BACHMAN et WILSON (1942) [107] déclaraient que leur produit final était « presque » homogène à l'électrophorèse (GURIN, 1944) [108]. KATZMAN et coll. (1943) [109] ne donnaient aucune preuve de l'homogénéité de leur hormone. CLAEISSON et coll. (1948) [110], après une électrophorèse à pH 7, prétendaient que leur substance cristallisée était homogène, mais ne présentaient pas de clichés. Enfin, MORRIS et MORRIS, dans un travail non publié (cf. MORRIS, 1954) [111], effectuaient des électrophorèses sur un produit qui s'avérait homogène à 5 pH différents. Ce résultat était infirmé par la sédimentation et les études de solubilité. De plus, il importe de signaler que cette hormone à haut potentiel ne provenait pas d'une urine de grossesse normale, mais d'une urine de malade souffrant d'un chorionépithéliome.

Ainsi, les principales techniques antérieures n'ont, en fait, jamais conduit à une hormone dont on ait pu affirmer l'homogénéité électrophorétique.

Si ce critère d'homogénéité n'est pas absolu et réclame une confirmation par des techniques basées sur des principes différents, il n'en reste pas moins que la mobilité, la courbe de mobilité en fonction du pH et le point isoélectrique sont, dans des conditions bien définies, autant de constantes physiques utilisées pour l'identification des protéines.

Au cours de la préparation, des électrophorèses ont été effectuées afin de juger du progrès accompli dans la purification, parallèlement à l'augmentation d'activité spécifique.

En fin de purification, l'hormone pure a été soumise à une étude électrophorétique poussée, d'une part, afin de déterminer la courbe de mobilité en fonction du pH et son point isoélectrique ; d'autre part, afin de vérifier son homogénéité dans une gamme étendue de pH.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

L'appareil utilisé était l'appareil à électrophorèse de TISELIUS, Modèle 38 de Perkin-Elmer. Cet appareil est pourvu d'une microcellule n'exigeant que 2 ml de solution protéique. Un bain de glace fondante tient lieu de thermostat.

Les tampons étaient en général composés d'ions monovalents qui n'ont pas d'effets spécifiques importants, et dont les interactions avec les protéines sont plus faibles que celles des ions polyvalents. Dans la mesure du possible, les pH étaient choisis au voisinage du pK de chaque tampon.

Ces tampons étaient les suivants :

Véronal sodique-acétate de sodium-HCl : pH 8,6.

Acide acétique-acétate de sodium : pH 4,5.

Glycocolle-HCl : pH 1,5 à pH 3,5.

Le pH était déterminé au pHmètre, à 25° C, selon la pratique courante, bien que l'électrophorèse se déroulat à 0° C.

La force ionique était toujours 0,1.

Le produit à analyser était mis en solution dans le tampon choisi et dialysé durant 18 heures, à 0° C, contre le même tampon.

La concentration en protéine variait entre 0,5 et 1 %, cette dernière concentration, relativement importante, étant souhaitable pour la recherche d'impuretés éventuelles. Toutes les fractions analysées ont toujours été parfaitement soluble quel que soit le pH du solvant.

La migration durait de 5.400 à 7.200 secondes.

La conductivité de la solution protéique dialysée était mesurée à 0° C dans une cellule de conductivité à électrodes de platine.

Le calcul de la mobilité était effectué à partir de la fraction descendante.

Sur chaque cliché étaient superposées la position de la frontière au temps 0 (diagramme inférieur) et la position de la frontière à la fin de la migration, la distance parcourue étant ainsi aisément mesurée.

RÉSULTATS

Les progrès de la purification ont été mis en évidence dans les trois clichés de la figure 9. Les trois électrophorèses ont été effectuées à pH 8,6 durant 7.200 sec. Le premier cliché est celui d'une fraction titrant 3.800 UI au milligramme (éluat kaolin). Il correspond à la figure 5 de l'électrophorèse sur amidon. La frontière principale, la plus lente, est celle de l'hormone. Sa mobilité est de $-2,5 \times 10^{-5}$ cm². volts⁻¹. sec⁻¹. On remarque l'importance de l'épaulement provoqué par des impuretés de mobilités supérieures.

Le deuxième cliché, qui correspond à la figure 6 de l'électrophorèse sur amidon, est l'éluat du premier passage sur Décalso, titrant 7.000 UI au milligramme. Un épaulement subsiste, mais beaucoup plus faible que dans le cliché précédent. La mobilité de la frontière hormonale est toujours $-2,5 \times 10^{-5}$.

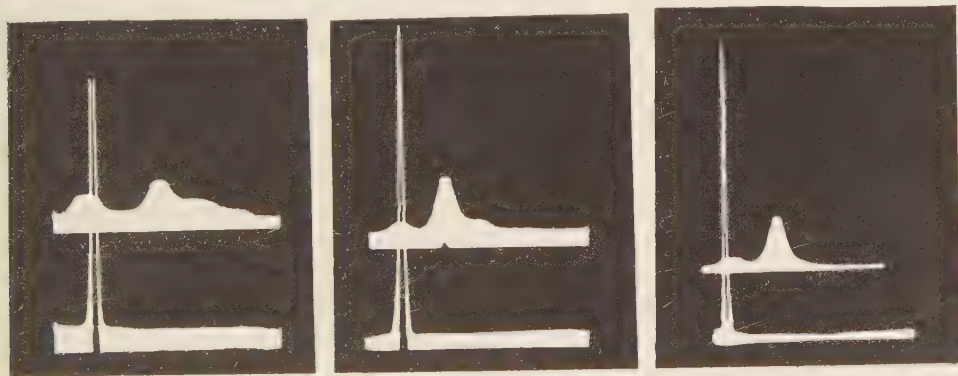


Fig. 9. — Electrophorèses libres de fractions correspondant à différents stades de la préparation. — pH 8,6 — 7.200 sec — E = 9,2 volts/cm — μ = 0,1. Fraction à 3.800 UI/mg. Fraction à 7.000 UI/mg. Hormone pure : 11.000 UI/mg.

Enfin, le dernier cliché est celui de l'hormone pure, obtenue soit par second passage sur Décalso, soit par passage sur Dowex 2, soit par purification par électrophorèse de zone. Il correspond à la figure 8 de l'électrophorèse sur amidon. On ne remarque plus de substances contaminantes. La frontière est parfaitement symétrique. La mobilité est toujours $-2,5 \times 10^{-5}$, valeur relativement faible.

Dans le double but de tracer la courbe de mobilité et de vérifier l'homogénéité de la frontière dans une gamme étendue de pH, l'hormone pure a été soumise à une série d'électrophorèses de pH 8,6 à pH 1,55.

La courbe de mobilité (courbe en trait plein de la figure 10) coupe l'axe des pH entre 2,9 et 3, avec un du/dpH₀ égal à $1,05 \times 10^{-5}$. Afin de pallier l'imprécision relative du calcul des mobilités, on a multiplié les électrophorèses au voisinage du pHi.

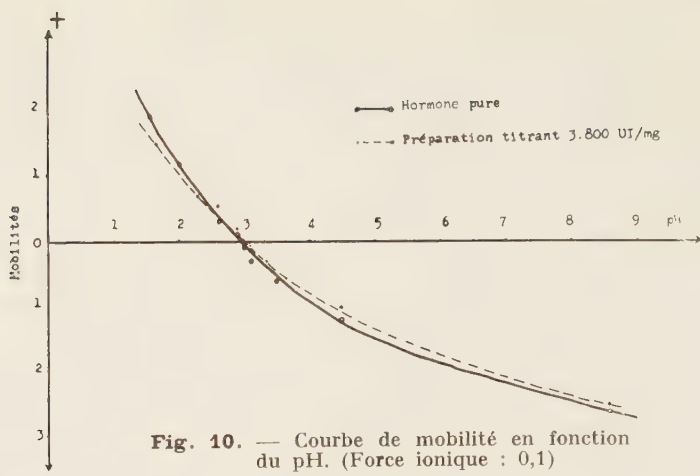


Fig. 10. — Courbe de mobilité en fonction du pH. (Force ionique : 0,1)

TABLEAU XVII
Mobilités à différents pH.

pH	Tampon	Mobilité
8,6	véronal	$-2,5 \times 10^{-5}$
4,5	acétate	$-2,2 \times 10^{-5}$
3,5	glycocolle	$-0,6 \times 10^{-5}$
3,1	—	$-0,3 \times 10^{-5}$
3	—	$-0,1 \times 10^{-5}$
2,9	—	$+0,1 \times 10^{-5}$
2,65	—	$+0,3 \times 10^{-5}$
2	—	$+1,2 \times 10^{-5}$
1,55	—	$+1,9 \times 10^{-5}$

La courbe en traits discontinus est une courbe de mobilité obtenue à partir d'une préparation titrant 3.800 UI au milligramme (cliché 1 de la figure 9). L'importance des impuretés encore présentes, les interactions électrostatiques entre les constituants, l'obligation de calculer la mobilité à partir de la frontière la plus lente (la conductivité au-dessus de cette frontière est un peu différente de celle de la solution protéique dialysée) entraînent une imprécision plus grande. Cependant, cette courbe ne s'écarte pas sensiblement de la précédente, qui reste une excellente caractéristique physique de la protéine hormonale.

Enfin, la figure 11 nous montre trois clichés d'électrophorèses effectuées sur l'hormone pure, respectivement à pH 2,9, 2,95 et 3, les autres conditions d'expérience étant identique dans les trois cas (tampon glycocolle 0,1 N, durée de la migration 5.400 secondes).

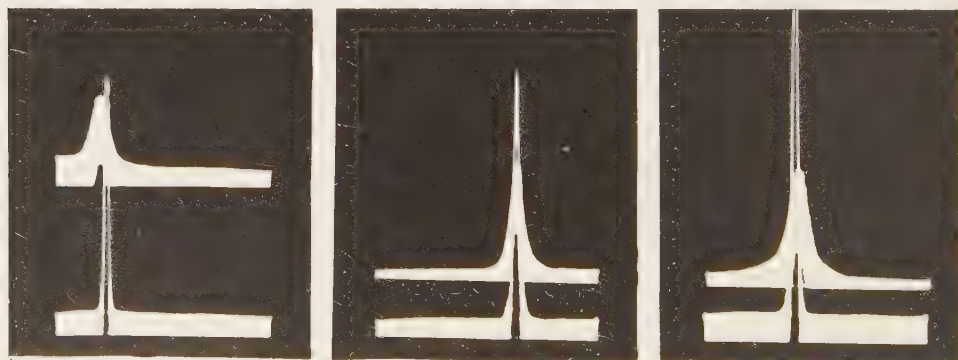


Fig. 11. — Electrophorèses libres de l'hormone pure à proximité du P_{Hi} . Tampon glycocolle 0,1 N — 5.400 sec. — $E = 6,8$ volts/cm — $\mu = 0,1$. pH = 2,9 pH = 2,95 pH = 3

A pH 2,9 et à pH 3, la frontière hormonale a légèrement migré d'un côté ou de l'autre de la position de départ, alors qu'à pH 2,95 la frontière initiale et la frontière en fin de migration sont rigoureusement superposées.

Le point isoélectrique de l'hormone est donc compris entre pH 2,9 et pH 3, dans le tampon glycolle de force ionique 0,1.

On remarquera également sur ces clichés l'homogénéité et la parfaite symétrie de la frontière hormonale ; le maintien de ces conditions entre pH 1,55 et pH 8,6 confirme la pureté du produit final de la purification.

SPIELMAN et MEYER (1938) [112] avaient indiqué un pHi de 3,3 à 3,5. Plus récemment, GURIN (1940) [113] estimait le point isoélectrique de l'hormone à l'aide d'un appareil de microélectrophorèse (BULL, 1935) [113] et trouvait 3,2-3,3 dans un tampon citrate 0,02 M.

Cependant la technique utilisée alors (charge sur des particules de collodion après adsorption de l'hormone) est maintenant dépassée, le pHi avait été en partie déterminé sur une préparation très impure, titrant 2.000 m.e.d. par milligramme, enfin une seule électrophorèse libre, à pH 7 dans un tampon phosphate, avait été effectuée, donnant une mobilité pour le composant actif de $-4,85$.

Nos résultats, pHi 2,9 — 3, mobilité à pH 8,6 = $-2,5 \times 10^{-5}$, diffèrent sensiblement des précédents. Pourtant, ils sont la conclusion d'une étude approfondie à l'aide d'un appareillage moderne, ayant permis de tracer une courbe de mobilité.

Il est donc vraisemblable que l'hormone à haute activité biologique, obtenue à la fin de notre technique de purification, n'est pas identique à celle de GURIN.

Ainsi, au cours de ce travail, l'électrophorèse sur papier a joué son rôle de première analyse ; en mettant en parallèle des courbes de concentration protéique et d'activité biologique sur des fractions obtenues à différents stades de la préparation, nous avons pu émettre l'hypothèse suivante sur l'état physico-chimique de la gonadotropine chorale humaine : l'hormone est excrétée dans l'urine sous forme de complexes labiles que la purification permet de scinder.

L'électrophorèse de zone sur amidon, dans son rôle préparatif, a apporté une technique physique de purification dont l'aboutissement est identique au produit final des méthodes chimiques.

Grâce à l'électrophorèse libre, on a pu déterminer le point isoélectrique (2,9-3), et la courbe de mobilité.

Enfin, la conjugaison des résultats obtenus par ces deux dernières techniques, l'unicité, la symétrie et la parfaite concordance des pics de concentration protéique et d'activité biologique dans l'électrophorèse sur amidon, le maintien de l'homogénéité de la frontière hormonale entre pH 1,5 et pH 8,6 dans l'électrophorèse libre, nous ont autorisés à conclure à la pureté de l'hormone.

SOLUBILITÉ

I. — COURBE DE SOLUBILITÉ

L'établissement d'une courbe de solubilité permet, en principe, d'avoir une image de la composition d'une fraction protéique, et, par suite, d'en déterminer le degré d'homogénéité.

Les diagrammes de solubilité peuvent être tracés, soit à température, force ionique et pH constants, mais à concentration en protéine variable, soit en modifiant le pouvoir solvant, par variation de la force ionique.

Dans ces conditions, le logarithme de la solubilité S d'une protéine pure, monodispersée, est une fonction linéaire de la concentration saline C . On peut appliquer la relation de COHN (1925) [115].

$$\text{Log. } S = \beta - K.C$$

dans laquelle la constante K est caractéristique de la protéine étudiée, pour un sel neutre donné, β exprimant par ailleurs l'influence du pH et de la température sur la valeur de $\text{Log. } S$.

Bien qu'il soit limité dans sa sensibilité, le test de solubilité est certainement un des critères de pureté des protéines les plus rigoureux.

A notre connaissance, aucune préparation d'hormone gonadotrope chorale n'a encore été soumise à ce test.

Pour ces diverses raisons, il nous est apparu indispensable d'appliquer cette méthode à notre produit terminal.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

Le sulfate d'ammonium à saturation a été choisi pour son pouvoir relargant élevé. De plus, les précipités obtenus par ce sel sédimentent plus facilement que ceux obtenus par le mélange de phosphates préconisé par BUTTLER et MONTGOMERY [116].

Afin de maintenir la constance du pH, la solution de sulfate d'ammonium était ajustée à pH 7 par l'ammoniaque ; de plus, l'hormone à tester était solubilisée dans une solution tamponnée (tampon phosphate M/15, pH 7).

La température était celle du laboratoire : 22° C environ. L'expérience était réalisée dans un local à température constante, où les écarts ne dépassaient pas 1° C.

La zone de précipitation avait été repérée par des essais préliminaires. Un demi ml de la solution d'hormone à une concentration de 6 mg par millilitre était pipeté dans une série de tubes. On y ajoutait, avec la même pipette, 3 ml de solutions salines de concentration croissante. Ces solutions, préparées à l'avance, avaient été choisies afin que les concentrations salines définitives couvrent la zone de précipitation.

Les tubes, bouchés, étaient abandonnés une nuit dans la pièce à température constante, temps suffisant pour que l'équilibre s'établisse.

Le dosage d'azote étant inutilisable en présence de l'ion ammonium, la concentration en protéine de chaque fraction devait être déterminée par analyse spectrophotométrique à 278 m μ .

Or, l'emploi de la filtration, pour séparer le précipité de la solution, présentait deux inconvénients : d'une part, il était pratiquement impossible d'obtenir un filtrat limpide ; d'autre part, le papier filtre (même le papier Whatman n° 1) provoquait une adsorption dans l'U.V. qui venait perturber les lectures.

Aussi les précipités étaient-ils recueillis par centrifugation. La lecture spectrophotométrique était effectuée sur les précipités remis en solution dans des volumes égaux d'eau distillée. En effet, les surnageants n'étaient pas toujours absolument limpides, et la mesure dans l'U.V. était faussée par le louche pouvant subsister.

RÉSULTATS

Une courbe de relargage a été établie sur l'hormone pure (fig. 12). En abscisse sont portés les pourcentages de saturation en sulfate d'ammonium, en ordonnée, le logarithme de la densité optique à 278 m μ correspondant à chaque précipité remis en solution. La densité optique étant proportionnelle à la concentration, on

peut donc admettre, à un facteur constant près, que son logarithme est celui de la concentration. Les lectures étant effectuées sur le précipité, c'est en quelque sorte l'opposé de la solubilité que l'on porte en ordonnée. Ceci ne modifie en rien l'allure générale de la courbe, mais change le signe de la pente.

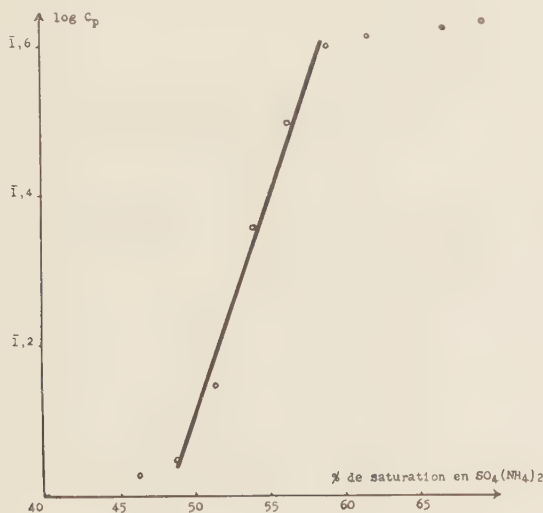


Fig. 12. — Courbe de solubilité.

La zone de précipitation s'étend de 49 à 59 % de saturation.

Entre ces deux valeurs, la courbe est une droite ; en deçà, l'hormone est intégralement en solution ; au-delà, tout est précipité, et les points obtenus s'alignent sensiblement sur une droite parallèle à l'axe des abscisses.

Dans ces conditions, la relation de COHN semble donc satisfaite : une preuve nouvelle de la monodispersion de l'hormone est ainsi apportée.

II. — CARACTÈRES DE SOLUBILITÉ

Des quelques caractères de solubilité rapportés antérieurement (GURIN, 1944) [117], certains ont été vérifiés : l'hormone pure est très soluble dans l'eau, même à des pH acides (1,5) ; soluble dans l'acétone et l'alcool à 50 %, elle précipite à 60 % d'alcool au voisinage de son point isoélectrique, et à des concentrations supérieures en alcool ou en acétone, en solution faiblement acide.

Elle ne précipite pas avec l'acide picrique, l'acide trichloracétique, l'acide sulfosalicylique, l'acide perchlorique, l'acide silicotungstique, même à fortes concentrations.

Elle ne coagule pas à la chaleur à pH 4,5.

Elle est également soluble dans les solutions salines concentrées (ClNa 5 N).

Contrairement aux données antérieures, elle n'est pas précipitée par l'acide phosphotungstique ni par l'acide phosphomolybdique.

L'hormone pure est donc caractérisée par son extrême solubilité devant les agents précipitants habituels des protéines.

SÉDIMENTATION

Si l'on excepte l'électrophorèse, l'ultracentrifugation est certainement la meilleure méthode que l'on puisse utiliser pour résoudre un système polydispersé en plusieurs constituants ; elle permet de mesurer la vitesse de sédimentation d'une protéine monodispersée, et de détecter, dans un mélange, la présence de plusieurs composés protéiques de vitesses de sédimentation différentes.

De plus, la méthode de la vitesse de sédimentation est une des principales méthodes de détermination du poids moléculaire des macromolécules.

LUNDGREN et coll. (1942) [118] avaient réalisé une étude de la sédimentation de l'hormone chorale, sur une préparation titrant 4.000 unités Friedman. Les ultracentrifugations étaient effectuées dans un tampon phosphate-borate de pH 7. Ils trouvaient comme constante de sédimentation : $s_{200} = 4,3 \times 10^{-13}$ cm/sec.

Nos ultracentrifugations ont été réalisées à la Station Centrale du C.N.R.S., dans une ultracentrifugeuse Spinco à entraînement électrique. La vitesse de rotation était de 59.780 tours par minutes. La température moyenne des expériences se trouvait toujours suffisamment proche de 20° pour qu'en première approximation, il ne soit pas nécessaire de faire une correction.

Les essais étaient effectués par série de trois : le premier sur une solution de protéine de concentration déterminée, les deux suivants sur des dilutions successives à partir de la solution mère.

Une première série utilisait comme solvant un tampon phosphate M/15 (phosphate monopotassique-phosphate disodique) de pH 7,3. On décelait un constituant principal, accompagné de corps de faible poids moléculaire.

Une deuxième série fut réalisée dans des conditions identiques, mais après avoir dialysé 18 heures contre le tampon, dans l'espoir d'éliminer ces contaminations. On obtenait encore un constituant principal accompagné de petites molécules (fig. 13).

La vitesse de sédimentation du constituant majeur augmentait lorsque la concentration diminuait. Les trois points obtenus étaient en ligne droite (fig. 14). La variation de la constante de sédimentation en fonction de la concentration était représentée par l'équation :

$$s = 2,7 S - 0,07 C$$

Ce qui donnait, pour une concentration nulle :

$$s = 2,7 \text{ unités Svedberg,}$$

valeur qui est en parfait accord avec l'extrapolation graphique.

C'est le décalage de la ligne de base, entre le point de départ et le pic de l'hormone, qui faisait supposer la présence de petites molécules, présence surprenante dans une hormone à haute activité, obtenue après une préparation minutieuse, purifiée en son dernier stade par chromatographie sur échangeur d'ions ou par électrophorèse de zone sur amidon, suivie de précipitation à 80 % d'alcool ou d'acétone. De plus, cette hormone répondait déjà à divers critères de pureté.

Peut-être le solvant employé n'était-il pas étranger à ce phénomène, une interaction se produisant entre la protéine et l'ion bivalent PO_4H^- .

Aussi, de nouvelles séries d'essais furent-elles tentées, en utilisant comme solvant le chlorure de sodium 0,1 M. La concentration en protéine étant toujours faible (0,6 % au maximum), on pouvait admettre que les variations de pH en fonction de la concentration seraient négligeables. La solution n'était donc pas tamponnée, mais son pH restait voisin de 7.

On ne décelait alors qu'un seul constituant, dont le pic était symétrique (fig. 15). La vitesse de sédimentation restait constante quelle que soit la concentration (fig. 14) et égale à 2,7 S.

Le Tableau XVIII résume ces expériences.

TABLEAU XVIII
Sédimentation

Tampon phosphate		Cl Na 0,1 M	
Concentration mg/ml	s (en unités Svedberg)	Concentration mg/ml	s (en unités Svedberg)
5,66	2,3	5,6	2,7
3,77	2,4	4,2	2,7
2,83	2,5	2,8	2,7

Ainsi les deux valeurs obtenues pour s à une concentration nulle sont identiques.
 $s = 2,7 \text{ S}$

Cette valeur est très différente de la valeur donnée par LUNDGREN.

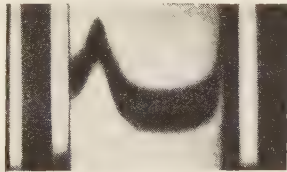


Fig. 13. — Sédimentation de l'hormone pure. Tampon phosphate.
 $C = 5,66 \text{ mg/ml}$ — $t = 20^{\circ}8$ — $s = 2,3 \text{ S}$.

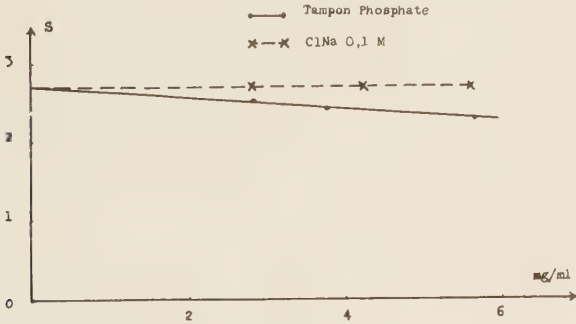


Fig. 14. — Variation de la constante de sédimentation en fonction de la concentration.



Fig. 15. — Sédimentation de l'hormone pure. ClNa 0,1 M.
 $C = 5,6 \text{ mg/ml}$ — $t = 20^{\circ}$ — $s = 2,7 \text{ S}$.

DIFFUSION

Les mesures du coefficient de diffusion D présente des difficultés techniques sérieuses. La convection et les vibrations doivent être soigneusement évitées, et la température contrôlée avec précision. La formation d'une frontière initiale suffisamment aiguë, entre le solvant et la solution, pose des problèmes délicats.

Plusieurs méthodes d'analyse des résultats peuvent être employées (LAMM et POLSON 1936, NEURATH 1942) [119]. Toutes ces méthodes impliquent que la courbe de gradient soit symétrique et gaussienne. Cela ne peut être vrai que si le corps dissous est mono dispersé, et si aucune interaction n'existe entre les molécules. Des solutions polydispersées peuvent donner des courbes symétriques, mais non gaussiennes ; tandis que les interactions conduisent à des courbes très déformées. Aussi est-il toujours désirable d'évaluer le coefficient de diffusion à partir d'une série donnée de courbes, par au moins deux méthodes : si elles donnent la même valeur de D à quelque % près, on a l'assurance que ces valeurs sont significatives (EDSALL 1953) [120].

En général, les valeurs données par différents chercheurs, sur la même protéine, diffèrent sensiblement. Une partie de ces variations peut être attribuée à des différences entre les échantillons de protéines, mais l'ensemble de ces écarts provient des incertitudes de la méthode elle-même.

La cellule et le système optique de l'appareil à électrophorèse de Tiselius peuvent également servir à la détermination de D (LONGWORTH 1951, 1952) [121] : la diffusion peut être mesurée à partir des courbes de gradient de réfraction, en observant l'élargissement en fonction du temps (des clichés sont pris périodiquement), d'une frontière initialement aiguë entre le solvant et la solution.

Trois méthodes d'analyse des résultats ont été employées :

1. La méthode des points d'inflexion :

$$D = \frac{\sigma^2}{2t} \times \frac{1}{G^2}$$

t est le temps en secondes, σ est la demi-largeur de la courbe en centimètres, au point d'inflexion dont l'ordonnée $H\sigma$ est égale à $H_m/\sqrt{e}$ (H_m : ordonnée maximum).

G est le facteur d'agrandissement de la cellule au cliché sur lequel les mesures sont effectuées.

2. La méthode surface-ordonnée maximum :

$$D = \frac{A^2}{4\pi t (H_m)^2} \times \frac{1}{G^2}$$

A est la surface en centimètre carré.

3. La méthode des cordes :

$$D = \frac{u^2}{4t l_n \frac{H_m}{H}} \times \frac{1}{G^2}$$

u est la demi-largeur de la courbe à l'ordonnée H .

Cette méthode se prête à tester la pureté, car, on doit obtenir, pour un corps monodispersé diffusant idéalement, la même valeur de D sur l'ensemble de la courbe (MOORE et WHITE 1950) [122].

LUNDGREN, en 1942 [123], avait déterminé pour l'hormone chorale une valeur de D . Deux expériences avaient été effectuées, à $\pm 2^\circ$, l'une dans une cellule de l'appareil de Tiselius, l'autre avec la cellule en acier de LAMM. La méthode de calcul était la méthode surface-ordonnée maximum.

Ramenée à 20°C , la valeur était : $D = 4,4 \times 10^{-7}$

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

L'expérience était réalisée à 20° C, dans un bain-marie dont la température était contrôlée à moins de 0°,5 près, à l'aide d'un thermostat.

L'hormone était dissoute dans l'eau bidistillée stérile, à une concentration de 0,7 % (21 mg dans 3 ml). Après quelques heures de dialyse, à température ambiante, contre l'eau distillée la cellule de l'appareil de Tiselius (Perkin-Elmer, modèle 38) était remplie comme dans le cas des électrophorèses. L'équilibre de température étant atteint dans le bain-marie, la frontière formée entre le solvant et la solution était amenée au milieu du champ optique, à l'aide d'un compensateur, à la plus faible vitesse : 2 cm de déplacement en 45 minutes. Quoique ayant subi un élargissement à la suite de ce déplacement, les frontières étaient encore très aiguës.

On adoptait pour temps 0, celui de la formation des frontières.

Afin d'éviter toute contamination, on avait opéré aussi stérilement que possible ; de plus, le maintien de l'activité physiologique était une garantie de la non-dénaturation de l'hormone, et par suite de la constance des propriétés physiques.

Les clichés destinés aux mesures étaient agrandis.

RÉSULTATS

Six clichés ont été pris à des intervalles de temps variables. On trouvera dans le Tableau XIX les valeurs de t, les valeurs correspondantes de H_m (multipliées par le facteur d'agrandissement : 5,4), les valeurs de 100/√t et du produit t.H_m².

TABLEAU XIX
Diffusion.

t (sec.)	100/√t	H _m (cm)	t.H _m ²
14.400	0,833	13,8	2.742.000
28.200	0,590	10,1	2.871.000
82.800	0,348	5,9	2.881.000
108.300	0,304	5,1	2.818.000
172.800	0,242	4,0	2.765.000
198.300	0,225	3,7	2.717.000

On remarquera que le produit t.H_m² est sensiblement constant.

La figure 16 représente d'ailleurs la courbe H_m = f(100/√t) : c'est une droite passant par l'origine. On a reproduit pour chaque temps le cliché correspondant : les courbes sont à peu près symétriques et gaussiennes.

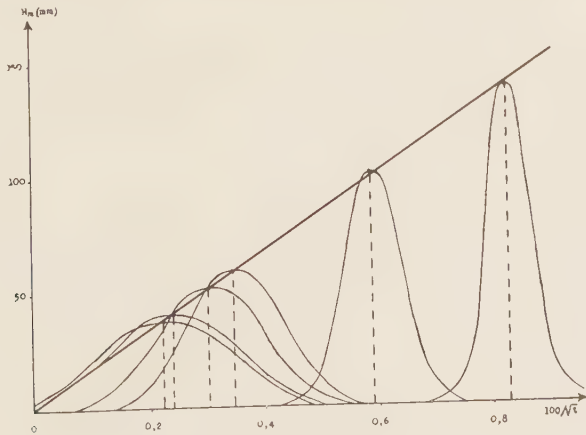


Fig. 16. — Diffusion : courbe H_m = f(100/√t).

LONGWORTH (1947) [124] définissait un facteur de correction du temps O, donnant pour D la formule suivante :

D = D' (1 + Δt/t)

(D' étant la valeur calculée à partir de la courbe).

Ce facteur de correction Δt devait compenser l'élargissement des frontières à leur formation. Nous n'avons effectué nos calculs que sur les trois derniers clichés, correspondant à des temps suffisamment élevés pour que le rapport $\Delta t/t$ devienne négligeable.

Les valeurs obtenues dans ces conditions pour D, sont rapportées dans le Tableau XX, pour les méthodes de calcul 1 (points d'inflexion) et 2 (surface-ordonnée maximum).

TABEAU XX

Valeurs de la constante de diffusion calculées par les méthodes « points d'inflexion » (1) et « surface — ordonnée maximum » (2)

t (sec)	D (Méthode 1)	D (Méthode 2)
108.300	$8,45 \times 10^{-7}$	$8,45 \times 10^{-7}$
172.800	$8,13 \times 10^{-7}$	$8,30 \times 10^{-7}$
198.300	$8,00 \times 10^{-7}$	$8,04 \times 10^{-7}$

On peut noter la bonne correspondance entre les deux méthodes. Les valeurs moyennes de D sont :

pour la méthode 1 : $8,19 \times 10^{-7}$
pour la méthode 2 : $8,26 \times 10^{-7}$

valeurs très voisines, la précision étant de l'ordre de 3 %.

Par la méthode 3, sur chacun des trois derniers clichés, la constante de diffusion a été calculée pour trois rapports H_m/H : 1,5, 2 et 3.

Le Tableau XXI résume ces calculs.

TABEAU XXI

Valeurs de la constante de diffusion calculées par la méthode des cordes.

t (sec)	D $\times 10^7$			
	$H_m/H = 1,5$	$H_m/H = 2$	$H_m/H = 3$	Moyenne
108.300	8,51	8,33	8,21	8,35
172.800	8,32	7,91	7,84	8,01
198.300	8,09	7,85	8,05	8,00

Dans chaque cliché, la concordance des valeurs obtenues pour trois hauteurs différentes, est encore acceptable, les variations étant toujours inférieures à 5 %. Une nouvelle preuve de la mono dispersion de l'hormone est ainsi apportée.

La valeur moyenne de cette méthode :

$$D = 8,12 \times 10^{-7}$$

est également voisine des valeurs obtenues précédemment.

En se basant sur les valeurs obtenues par trois méthodes de calcul différentes, on peut prendre pour constante de diffusion de l'hormone choriale humaine, avec une précision de 3 à 4 % (le solvant étant l'eau, et la température 20°) :

$$D = 8,2 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ par seconde}$$

Valeur absolument différente de celle de LUNDGREN : $4,4 \times 10^{-7}$.

VOLUME SPÉCIFIQUE PARTIEL

La détermination du volume spécifique partiel est fondamentale dans l'évaluation du poids moléculaire par l'étude de la sédimentation dans l'ultracentrifugation. La force centrifuge effective, agissant sur la molécule de protéine, est proportionnelle à la différence de densité entre la protéine et le milieu ambiant : en première approximation, nous pouvons prendre la densité de la protéine en solution comme l'inverse du volume spécifique partiel (EDSALL, 1953) [125].

Le volume spécifique partiel V d'une protéine est l'augmentation de volume résultant de l'addition de 1 g de protéine sèche à un volume très important de solution. Le volume molaire partiel $\bar{V}$ est égal à V multiplié par le poids moléculaire. Le volume spécifique partiel de la plupart des protéines simples est compris 0,70 et 0,75 ml/g.

Dans l'évaluation du poids moléculaire par la formule de SVEDBERG, une erreur de 1 % sur la valeur de V introduit une erreur de 3 % dans le facteur $(1 - V\rho)$. Une détermination précise de V est donc indispensable.

Il est commode de définir une quantité, le volume spécifique apparent, qui est liée étroitement au volume spécifique partiel et qui est plus facilement mesurable.

Si d_1 est la densité du solvant pur, et d celle de la solution de protéine, C la concentration en grammes par litre, le volume spécifique apparent est donné par la formule :

$$\varphi = \frac{1.000}{C} \cdot \frac{d_1 - d}{d_1} + \frac{1}{d_1}$$

Dans le cas des solutions diluées, les volumes spécifiques apparents et partiels sont pratiquement identiques.

Expérimentalement, φ est calculé à partir des mesures des densités du solvant et de la solution, à une concentration déterminée.

On ne trouve dans la littérature qu'une seule valeur de volume spécifique partiel pour l'hormone chorale : celle de LUNGREN (1942) [126], $0,76 \pm 5 \%$, valeur imprécise qui semble élevée pour une glucoprotéine.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

Parmi les méthodes de détermination de densité, la méthode pycnométrique a été la plus largement employée.

Un pycnomètre de haute précision, malgré son faible volume, fut utilisé. Il comprend une boule de 2 ml environ, identique à celle des pipettes à boule, prolongée de part et d'autre par un capillaire. Chacun des capillaires est divisé en trente divisions identiques dont les volumes correspondants sont égaux.

Une première série de mesures consistait à étalonner l'instrument, c'est-à-dire à déterminer les poids de solvant correspondant à différents nombres de divisions : chaque division représentant un volume égal, la courbe de poids en fonction du nombre de divisions devait être rectiligne.

Après son remplissage (effectué par aspiration à l'aide d'une poire de caoutchouc commandée par une vis micrométrique), le pycnomètre était introduit dans un tube de verre fin que l'on bouchait hermétiquement et que l'on trempait dans un thermostat de précision (1/100 de degré) réglé à 20° C. On attendait l'équilibre de température, puis on repérait sur chaque capillaire la position du ménisque, en estimant éventuellement une demi-division. Le pycnomètre était alors sorti du bain-marie et pesé sur une balance au 1/1.000 de mg, l'instrument vide ayant été taré précédemment.

La courbe d'étalonnage étant ainsi tracée, le pycnomètre était vidé, séché, puis rempli à nouveau par la solution de protéines (à une concentration de 1 % environ). Une série de déterminations identiques aux précédentes était effectuée.

La courbe des poids de solution en fonction des volumes, devait être une droite de pente légèrement supérieure à la précédente (sur le graphique, les deux droites paraissent parallèles, car les deux pentes sont très voisines, et la représentation ne correspond qu'à une très faible portion de droite), car la densité de la solution était plus élevée que la densité du solvant.

Soit p_1 le poids d'un volume v de solvant,

p le poids d'un même volume de solution :

$$p_1 = vd_1, \text{ et } p = vd; \text{ d'où l'on tire : } d = d_1 \cdot p/p_1.$$

Portons cette valeur de d dans l'équation (1). On obtient :

$$\varphi = \frac{1.000}{C} \cdot \frac{p_1 - p}{p_1} + \frac{1}{d_1} \quad (2)$$

Ainsi, connaissant la concentration C de la solution de protéine et la densité d_1 du solvant, la mesure du volume spécifique apparent se ramenait à la détermination des poids p_1 et p d'un même volume de solvant et de solution.

La précision de cette mesure dépendait essentiellement de la température, car une faible variation de celle-ci entraînait évidemment une variation de volume immédiatement sensible sur la lecture des divisions des capillaires : il fallait donc attendre un équilibre complet de la température du bain-marie et du pycnomètre.

RÉSULTATS

Le solvant employé était un tampon phosphate M/15 de pH 7,5. Sa densité déterminée préalablement était :

$$d_1 = 1,0076 \text{ à } 20^\circ \text{C}$$

La concentration en protéine C était, en grammes par litre :

$$C = 9,91$$

Les poids de solvant ont été mesurés pour des volumes correspondant aux divisions 15, 23, 34 et 49, les poids de solution pour les divisions 15, 33,5 et 40.

La figure 17 représente les deux courbes de poids en fonction du volume (ou du nombre de division).

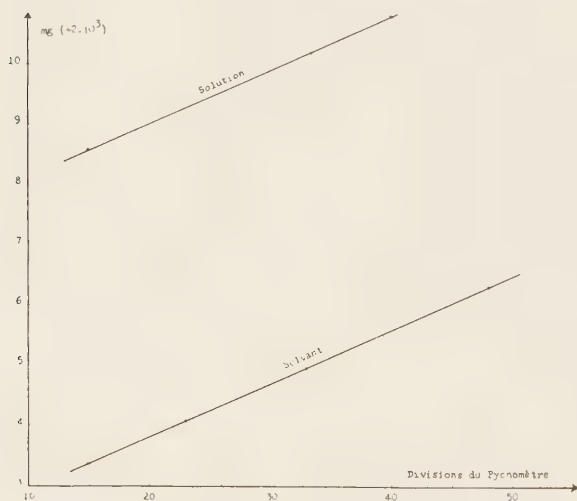


Fig. 17. — Courbes de poids de solution et de solvant en fonction du nombre de divisions du pycnomètre.

Pour les divisions 33,5 et 40, le poids du solvant a été déterminé sur la courbe d'étalonnage du pycnomètre.

Trois valeurs de φ ont été ainsi calculées : le Tableau XXII résume l'ensemble des mesures.

TABLEAU XXII
Volume spécifique partiel.

Divisions	p_1 (μg)	p (μg)	φ
15	2.003.360	2.008.570	0,728
23	2.004.070		
33	2.004.915		
33,5	2.004.920*	2.010.124	0,7285
40	2.005.480*	2.010.740	0,7258
49	2.006.240		

(*) Valeurs déterminées sur la courbe.

La moyenne des trois valeurs obtenues pour φ (ou pour V) est donc :

$$V = 0,727 \quad (5)$$

Valeur nettement différente de celle donnée précédemment par LUNDGREN.

POIDS MOLÉCULAIRE

PEDERSEN (1953) [127] définissait une molécule de protéine, comme étant « la plus petite particule possédant toutes les propriétés physiques, chimiques et biologiques » de la substance envisagée, le poids moléculaire étant égal au poids de la molécule non hydratée, multiplié par le nombre d'AVOGADRO.

Notre hormone finale ayant satisfait à un certain nombre de critères, on peut la considérer comme une entité dont il paraît justifié de déterminer le poids moléculaire M.

La plupart des méthodes de détermination de M sont basées sur des mesures physico-chimiques : l'une des plus couramment utilisées est celle de la vitesse de sédimentation, surtout depuis la généralisation de l'emploi de l'ultracentrifugeuse Spinco.

Le poids moléculaire est alors donné par la formule de SVEDBERG :

$$M = \frac{RTs}{D(1 - v\rho)}$$

dans laquelle : R est la constante des gaz parfaits,

T la température absolue,

s la vitesse de sédimentation extrapolée à une concentration nulle en protéine,

D la constante de diffusion,

v le volume spécifique partiel,

ρ la densité du solvant.

(Pour les protéines, l'eau à 20° C est généralement choisie comme condition standard).

LUNDGREN (1942) [128] avait déterminé le poids moléculaire d'une hormone chorale préparée selon GURIN (1939) [129] : il trouvait par cette méthode :
M = 100.000

Plus récemment, ODEBLAD (1955) [130] estimait le poids moléculaire à partir de l'inactivation d'une hormone commerciale, par les particules α . Il donnait une valeur maximum de 120.000, avec une large imprécision.

— **RÉSULTAT.** — En utilisant les résultats obtenus précédemment :

$$R = 8,3136 \times 10^7$$

$$T = 293$$

$$s = 2,7 \times 10^{-13}$$

$$D = 8,2 \times 10^{-7}$$

$$v = 0,727$$

$$\rho = 1$$

On obtient :

$$M = 30.000$$

valeur complètement différente des valeurs antérieures.

DIFFUSION DE LA LUMIÈRE

Le poids moléculaire d'un corps en solution s'exprime en fonction de l'intensité lumineuse diffusée dans un faisceau polarisé verticalement, par la relation :

$$1/M = H'C/I + 2 BC, \text{ avec } 1/H' = \lambda^4 \cdot \frac{k}{(\delta n/\delta C)^2 \cdot \varphi(\rho)}$$

λ étant la longueur d'onde dans le vide ($\lambda = 4358$), $\delta n/\delta C$ l'incrément d'indice de réfraction, φ le facteur de dépolarisation, C la concentration, k une constante qui dépend de l'appareil et B un coefficient qui traduit l'interaction entre les molécules.

De la relation précédente, on tire la valeur du poids moléculaire :

$$M = 1/H' \cdot \lim (I_d/C)_{C \rightarrow 0}$$

L'intensité diffusée par le corps dissous I_d peut être considérée, en première approximation, comme la différence entre l'intensité diffusée par la solution et l'intensité diffusée par le solvant.

Les mesures d'intensité diffusée sont faites sur des solutions à différentes concentrations, sous un angle d'observation $\theta = 130^\circ$; l'appareil et la technique ont été décrits par ailleurs (GUINAND et TONNELAT, 1954 — GUINAND et JOLIOT, 1957) [131]. Pour déterminer le poids moléculaire du corps en solution, la valeur de l'intensité spécifique $(I/C)_{C \rightarrow 0}$ mesurée a été comparée à celle obtenue d'autre part pour un étalon de poids moléculaire connu. L'étalon choisi était la β -lactoglobuline (préparée sous forme cristallisée au laboratoire de Biologie Physico-chimique), de même incrément d'indice que la protéine étudiée et de facteur de dépolarisation voisin.

Les solutions à différentes concentrations ont été préparées extemporanément, en ajoutant au solvant pur des quantités connues d'une solution concentrée (le solvant et la solution ont été préalablement soumis à un champ centrifuge de 150.000 g pendant une heure).

Les concentrations des solutions sont déterminées par la méthode spectrophotométrique.

Avec un pH voisin de la neutralité et une force ionique égale à 0,1 (en milieu ClNa 0,1 M), la courbe $I = f(C)$ est une droite dont la pente donne la valeur du poids moléculaire.

Pour la β - lactoglobuline :

$$I/C = 0,37 \text{ (I est exprimé en unités arbitraires).}$$

Pour l'hormone chorale :

$$I/C = 0,30.$$

La valeur généralement admise pour le poids moléculaire de la β - lactoglobuline étant 36.000, on trouve donc pour l'hormone chorale :

$$M = 29.000 \pm 2.000$$

Il faut noter l'excellente concordance entre cette valeur du poids moléculaire et la valeur obtenue par la méthode de la vitesse de sédimentation.

Ces mesures ont été effectuées au laboratoire de BIOLOGIE PHYSICO-CHIMIQUE, par Mlle S. GUINAND, que nous sommes particulièrement heureux de remercier.

RAPPORT DE FRICTION

EINSTEIN (1905) et SMOLUCHOWSKI (1906) [132] relient le coefficient de diffusion à la forme et aux dimensions de la molécule.

La vitesse de diffusion est directement proportionnelle à l'énergie thermique de la molécule, qui est égale à kT en vertu du principe de l'équipartition de l'énergie (k : constante de Boltzman). Mais la diffusion est retardée par la résistance visqueuse que les particules éprouvent lorsqu'elles se meuvent dans le milieu, et qui peut être caractérisée par le coefficient de friction.

Pour une particule sphérique, de rayon r , se déplaçant à une vitesse v dans un milieu de viscosité η , la résistance est égale à $6 \pi \eta r v$ (à condition que la vitesse soit relativement lente) et le coefficient de friction est simplement le facteur $6 \pi \eta r$.

Nous pouvons écrire, pour une sphère :

$$D_{\text{sphère}} = \frac{kT}{6 \pi \eta r} \quad (1)$$

et pour une particule de forme quelconque :

$$D = \frac{kT}{f} \quad (2)$$

f est en général proportionnel à la viscosité du milieu, et à un facteur ayant les dimensions d'une longueur, qui est fonction de la forme et des dimensions de la molécule.

Admettons, par hypothèse, que la molécule de protéine est sphérique, de poids moléculaire anhydre M ; supposons qu'elle ne lie aucun solvant quand elle est dissoute dans l'eau ou dans d'autres milieux, et que la densité de la particule anhydre est donnée par l'inverse du volume spécifique partiel V . Le volume moléculaire est Mv , et le volume d'une seule molécule : Mv/N .

Mais, dans ce cas, le volume de la molécule sphérique est aussi égal à $4\pi r_0^3/3$, r_0 étant le rayon.

On a donc : $4\pi r_0^3/3 = Mv/N$.

Pour une telle molécule sphérique, le coefficient de friction est alors :

$$f_0 = 6 \pi \eta r_0 = 6 \pi \eta (3Mv/4 N)^{1/3}$$

$$\text{ou } f_0 = \eta (162\pi f Mv/N)^{1/3} \quad (3)$$

A partir de cette équation, on peut donc calculer une valeur de f_0 pour une protéine de poids moléculaire et de volume spécifique partiel connus, en solution dans un milieu de viscosité connue.

Connaissant f_0 , par l'équation (2) on en déduit une valeur D_0 du coefficient de diffusion qu'aurait la protéine si elle répondait aux hypothèses émises plus haut.

$$D_0 = \frac{kT}{f_0}$$

D'autre part, on connaît la valeur observée du coefficient de diffusion :

$$D = \frac{kT}{f}$$

On peut ainsi obtenir la valeur du rapport :

$$f/f_0 = D_0/D$$

qui est le rapport de friction.

En pratique, le rapport de friction est toujours plus grand que l'unité, ce dont on peut conclure qu'aucune protéine en solution ne peut être considérée comme

une sphère anhydre. En effet, l'écart de f/f_0 avec l'unité provient de ce que la molécule est hydratée, ou de ce que sa forme n'est pas sphérique, ou des deux causes réunies.

Des calculs de f/f_0 ont été faits pour des ellipsoïdes de révolution par PERRIN (1936) et par HERZOG, ILLIG et KUDAR (1934) [133].

Les équations obtenues donnent les valeurs de f/f_0 en fonction du rapport $\epsilon = b/a$, où b est le demi-axe équatorial de l'ellipsoïde, et a , le demi-axe de révolution.

Les diagrammes de ONCLEY (1941) [134] permettent de déterminer les diverses valeurs d'asymétrie ou de solvation qui sont compatibles avec une valeur donnée de f/f_0 .

Cependant l'interprétation du rapport de friction est ambiguë, car si l'on connaît le degré de solvation, une incertitude subsiste dans le choix d'une valeur de ϵ plus grande ou plus petite que l'unité.

Enfin, rien ne prouve que l'ellipsoïde de révolution soit une forme particulièrement bien approchée de la molécule de protéine : ce que l'on peut retirer de ces résultats, est la forme et les dimensions de l'ellipsoïde de révolution qui s'adapte d'une façon aussi proche que possible au comportement de la molécule de protéine en solution.

RÉSULTAT

En utilisant les résultats obtenus précédemment :

$$\eta = 0,01 \text{ poise pour l'eau à } 20^\circ \text{ C}$$

$$M = 30.000$$

$$V = 0,727$$

$$N = 6,02 \times 10^{-23}$$

$$k = 1,38 \times 10^{-16}$$

$$D = 8,2 \times 10^{-7}$$

$$T = 293$$

on tire : $f_0 = 0,3849 \times 10^{-7}$

$$D_0 = 10,5 \times 10^{-7}$$

et par suite : $f/f_0 = 1,28$

POUVOIR ROTATOIRE

Toutes les protéines en solution modifient l'orientation de la lumière polarisée qui les traverse. Cette propriété est la conséquence de la présence des carbones asymétriques dans tous les acides α -aminés (sauf le glycocolle). Le signe et la grandeur de la rotation optique dépendent non seulement de la composition, c'est-à-dire, des types d'atomes ou de groupes d'atomes liés aux carbones asymétriques, mais encore des relations entre eux des carbones asymétriques, à l'intérieur de la même molécule.

En outre, la rotation est extrêmement sensible aux variations dans les interactions des groupes substituants avec leur milieu.

Actuellement, il apparaît que la configuration de la chaîne polypeptidique est le facteur le plus important pour justifier les différences dans l'activité optique des protéines.

Celles-ci présentent deux caractéristiques essentielles : les rotations spécifiques sont toujours négatives (lévogyres) ; d'autre part, les valeurs sont généralement comprises dans un intervalle relativement étroit : -30° à -70° .

Pour exprimer la rotation optique d'une substance en solution, on définit communément le pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]$ comme étant le quotient de la rotation observée par la longueur L du tube traversé et la concentration C de la solution, c'est-à-dire la masse de substance active contenue dans l'unité de volume de la solution, pour une radiation λ et une température t donnée.

$$[\alpha] = \frac{t}{\lambda} \cdot \frac{\alpha}{L C}$$

L est exprimée en décimètre, C en grammes par millilitre.

Il est d'usage, depuis BIOT, de compter positivement les rotations des substances dextrogyres, négativement celles des substances lévogyres.

A notre connaissance, aucune valeur du pouvoir rotatoire de l'hormone choriale n'a encore été donnée.

RÉSULTAT

La radiation utilisée était la raie D du sodium. L'hormone était dissoute à la température du laboratoire ($t = 20^\circ$) dans l'eau distillée, à une concentration de 44 mg par millilitre ($C = 0,044$).

La longueur du tube était 5 cm ($L = 0,5$ décimètre).

On observait une rotation de : $-1^\circ 30'$

Soit un pouvoir rotatoire spécifique :

$$[\alpha]_{D}^{20^\circ} = -68^\circ$$

SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET

La plupart des protéines, incolores en solution, absorbent sélectivement dans la région de 2.500 à 3.000 Å. Le coefficient d'absorption, aux alentours de 2.800 Å, pour les protéines pures, est constant dans une gamme étendue de pH (4 à 9) et de force ionique : la densité optique peut donc servir à la détermination rapide de la concentration, tandis que l'ensemble du spectre peut-être un moyen simple d'identification.

Cette absorption dans l'ultra-violet, présente deux caractéristiques essentielles : les similitudes et les différences entre les spectres des protéines et ceux de leurs constituants, aminoacides ou simple polypeptides.

Sous certains rapports, cette absorption est suffisamment liée aux aminoacides aromatiques, contenus dans la molécule, pour permettre la détermination quantitative de la tyrosine et du tryptophane. D'autre part, il devint de plus en plus évident, ces dernières années, que certaines anomalies du spectre U-V des aminoacides aromatiques, produites par leur combinaison dans les protéines, pouvaient jeter quelque lumière sur la structure des protéines (DOTY et GEIDUSCHEK 1953) [135].

Les protéines sont en général faciles à examiner par les méthodes usuelles de spectrophotométrie. Elles sont assez stables à l'irradiation par les radiations ultra-violettes d'intensité et de longueurs d'onde utilisées dans de telles méthodes.

Si l'on veut calculer le coefficient d'extinction, deux conditions sont à respecter : d'une part, la solution doit être absolument limpide ; d'autre part, la concentration en protéine, liée à l'intensité de l'absorption mesurée, doit être déterminée avec la plus grande précision, ce qui suppose une connaissance exacte du poids sec de la protéine.

Si les spectres d'absorption du tryptophane et de la phénylalanine ne sont que peu modifiés par le pH (BEAVEN et HOLIDAY, 1952) [136], il n'en est pas de même pour la tyrosine. Peu sensible au pH entre 1 et 8, l'absorption due à la tyrosine se modifie progressivement à partir de pH 8, le changement étant complet à pH 12. Quantitativement, ces variations sont en rapport direct avec l'ionisation du groupement hydroxyle phénolique. Aussi les protéines contenant de la tyrosine doivent-elles montrer une modification de leur spectre pour des valeurs élevées du pH : l'absorption se déplace vers les longueurs d'onde croissantes, et son intensité augmente sensiblement.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

On a utilisé le spectrophotomètre électronique de Jobin et Yvon. (Une analyse statistique, effectuée par GRIDGEMAN en 1951 [137], de 75 spectrophotomètres photoélectriques, a révélé un coefficient de variation de 1,6 % entre ces différents appareils.)

La source était une lampe à arc dans l'hydrogène, le récepteur photoélectrique était une cellule à vide à cathode d'antimoine-caesium. Les cuves rectangulaires, en silice, de 1 cm d'épaisseur avaient été préalablement étalonnées.

Le spectrophotomètre n'étant pas enregistreur, les spectres étaient tracés point par point, de 5 en 5 m μ .

Trois solvants furent utilisés : HCl 0,1 N, H₂O et NaOH 0,1 N. Les concentrations étaient de l'ordre de 400 μ g d'hormone par ml.

RÉSULTATS

La figure 18 montre les trois spectres ainsi obtenus. Les valeurs de l'absorption sont exprimées en coefficient d'extinction pour une épaisseur de 1 cm, et une concentration de 1 %.



Fig. 18. — Spectres d'absorption dans l'ultra-violet. Solvants : HCl 0,1N - H_2O - NaOH 0,1N.

On remarquera que les spectres obtenus dans l'eau et dans HCl 0, 1N sont sensiblement identiques.

Par contre, ainsi qu'on pouvait le supposer, le spectre à pH 13 est nettement différent, l'absorption, plus élevée, s'étant déplacée vers les longueurs d'onde croissantes.

On peut donc en déduire la présence de tyrosine dans la molécule.

Notons cependant l'intensité assez faible de l'absorption entre 2.500 et 3.000 Å : il est donc vraisemblable que la tyrosine et le tryptophane, sont en faible proportion dans la protéine hormonale.

Le coefficient d'extinction à 278 $m\mu$, pour une épaisseur de 1 cm et une concentration de 1 % a été calculé :

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 4,25$$

DÉTERMINATION SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DE LA TYROSINE ET DU TRYPTOPHANE

Déjà, en 1883, SORET [138] suggérait que l'absorption des protéines dans l'U-V était due aux aminoacides aromatiques présents dans la molécule. Cette hypothèse a été largement confirmée depuis, et les méthodes spectrophotométriques quantitatives ont permis d'établir une technique de détermination de la tyrosine et du tryptophane qui peut être le meilleur moyen de doser ces deux aminoacides dans une protéine. En effet, l'instabilité du tryptophane dans les conditions requises pour hydrolyser les protéines, ajoute à la faveur dont jouit une méthode spectrophotométrique qui permet une détermination directe du tryptophane sur la protéine non hydrolysée.

Pour l'hormone choriale, on a seulement rapporté la présence de tyrosine, et celle du tryptophane en faible concentration (BATES 1943, résultats non publiés ; cf. GURIN 1944) [139]. Cependant, LI (1949) [140] déclare avoir préparé une hormone hautement purifiée selon la méthode de GURIN, à partir d'un produit commercial : le dosage de la tyrosine et du tryptophane effectué sur ce produit purifié, selon la méthode de LUGG (1937) [141] donnait comme pourcentages : 1,2 % de tyrosine et 0,15 % de tryptophane.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

Plusieurs méthodes de dosage spectrophotométrique de ces deux aminoacides ont été proposées : celle de GOODWIN et MORTON (1946) [142] a été particulièrement employée.

Elle nécessite la mesure des densités optiques d'une solution de protéine dans la soude N/10 à 2.800 et 2.944 Å. (Cette longueur d'onde correspondant à l'égalité d'absorption pour des solutions équimoléculaire de tyrosine et de tryptophane dans la soude N/10).

La solution doit être évidemment aussi limpide que possible : la quasi-nullité de l'absorption vers 3.200 Å (voir figure du paragraphe « Spectre d'absorption dans l'U.V. ») est une garantie de la limpidité.

RÉSULTATS

Trois mesures ont été faites sur trois préparations différentes. Le Tableau XXIII résume les mesures et les résultats obtenus.

Les valeurs des coefficients d'extinction moléculaire de la tyrosine (A) et du tryptophane (B), intervenant dans les calculs, sont celles proposées par GOODWIN et MORTON :

$$\begin{array}{ll} \text{pour } \lambda = 2.944 & A = B = 2.375 \\ \lambda = 2.800 & B = 5.225 \quad A = 1.576 \\ & B - A = 3.649 \end{array}$$

Si l'on appelle y et x les concentrations en molécule-gramme par litre de la tyrosine, et de la tyrosine et du tryptophane, l'absorption de la solution de protéine est donc égale à :

$$D = yA + (x - y)B$$

Soit pour

$$\lambda = 2.944 \quad x = \frac{D_{2.944}}{2.375}$$

$$\text{et pour } \lambda = 2.800 \quad y = \frac{5.225 x - D_{2.800}}{3.649}$$

TABLEAU XXIII

Détermination spectrophotométrique de la tyrosine et du tryptophane

Concentration de l'hormone en mg/ml	Densité optique		Tyrosine en g/100 g d'hormone	Tryptophane en g/100 g d'hormone
	$\lambda = 2.944 \text{ \AA}$	$\lambda = 2.800 \text{ \AA}$		
0,513	0,223	0,260	2,3	1,15
0,440	0,201	0,219	2,5	1,1
1,333	0,520	0,630	2,1	1,0

Soit en moyenne : 2,3 % de tyrosine,
1,1 % de tryptophane.

Le rapport molaire Tyrosine sur Tryptophane, qui est une caractéristique usuelle des protéines, a été calculé :

$$\frac{M_{\text{tyr.}}}{M_{\text{trypt.}}} = 2,4$$

Notons l'imprécision relative de ce dosage, due, ici, en partie à la faible proportion de tyrosine et de tryptophane.

RÉSIDUS N - TERMINAUX

La méthode de détermination des résidus N - terminaux par le fluorodinitrobenzène (FDNB) est maintenant bien établie (SANGER 1945) [142]. Les dérivés dinitrophényles de presque tous les aminoacides courants ont été préparés, et douze aminoacides ont été montrés comme occupant la position N-terminale (CHIBNALL 1953) [144].

Les avantages particuliers de cette méthode sont la condensation qualitative avec le réactif, sans réactions parasites, et la manipulation relativement aisée des DNP-aminoacides produits, grâce à leur coloration jaune-vif. L'inconvénient de cette méthode réside surtout dans les pertes dont souffrent les DNP-aminoacides terminaux, lors de l'hydrolyse (LEVY 1955) [145]. Aussi certaines précautions doivent-elles être prises.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

1) *Réaction avec le FDNB.* Le procédé suivant a été utilisé (PORTER 1951) [146] : 46 mg d'hormone et un poids égal de bicarbonate de soude étaient repris dans 1 ml d'eau (la dissolution était complète). On y ajoutait 2 ml d'une solution à 5 % de FDNB dans l'alcool absolu. Le mélange était agité pendant deux heures à température ambiante. On acidifiait alors avec quelques gouttes d'HCl concentré, puis on extrayait par 25 ml d'éther, quatre fois, éliminant ainsi l'alcool, le FDNB en excès, et le dinitrophénol. La phase aqueuse était neutralisée par la soude normale, et la DNP-protéine précipitée quantitativement par 5 volumes d'alcool.

Le précipité ainsi obtenu pesait après séchage : 44 mg.

2) *Hydrolyse.* L'hydrolyse standard était effectuée à partir de ce précipité, en tube scellé, dans l'acide chlorhydrique Merk 5,7 N à 105° pendant 16 heures.

Cependant, trois autres hydrolyses étaient également pratiquées (ROVERY, FABRE et DESNEULLE 1953) [147] : durant 8 heures, pour rechercher le DNP-glycocolle ; durant 30 heures pour les DNP-amino-acides hydrosolubles ; enfin dans HCl 12 N (en fait, dans l'acide chlorhydrique Merk pur à 36 %), pendant 24 heures pour la proline (PORTER et SANGER 1948) [148].

La concentration était toujours : 1 pour 1.000.

3) *Extraction et chromatographie sur papier des DNP-aminoacides.*

Les hydrolysats étaient dilués jusqu'à la normalité en HCl, et extraits quatre fois par l'éther ; les extraits étherés mélangés étaient lavés par H₂O et l'eau de lavage réunie à la phase aqueuse. Les deux phases étaient évaporées à sec (la phase aqueuse était reprise par H₂O et évaporée au dessiccateur sur potasse, jusqu'à disparition complète de l'acide chlorhydrique).

Pour la phase aqueuse, les chromatographies sur papier étaient effectuées dans le solvant n-butanol/acide acétique/eau (4/1/5), avec 35 cm de migration descendante.

Toutefois, l' ϵ -mono-DNP-lysine et l' α -DNP-arginine n'étaient pas suffisamment séparées dans ces conditions ; un deuxième système solvant fut donc utilisé : pyridine/alcool isoamylique/ammoniaque 1,6 N (3/7/10) ; les R_f respectifs de ces DNP-aminoacides étaient alors : 0,40 et 0,57 (BISERTE et OSTEUX 1951) [149], assez différents pour permettre une résolution convenable. Un témoin α -DNP-arginine était adjoint sur la chromatographie.

De plus, une bande était révélée par le réactif de Sakaguchi puisque la dinitrophénylation laisse le groupement guanidique intact.

RÉSULTATS

Quel que soit le mode d'hydrolyse, aucun DNP-aminoacide n'était extrait par l'éther qui restait toujours incolore.

La recherche d'un résidu NH_2 -terminal se circonscrivait donc à la phase aqueuse.

La chromatographie de cette phase dans le mélange butanol/acide acétique/eau ne montrait qu'une seule tâche, au niveau de la leucine, correspondant à l' ϵ -mono-DNP-lysine. Aucune coloration rouge n'apparaissait avec le réactif de Sakaguchi ; mais, l' α -DNP-arginine pouvait se trouver au même niveau, masquée par les quantités beaucoup plus importantes d' ϵ -mono-DNP-lysine.

Dans le deuxième solvant utilisé, où ces deux DNP-aminoacides sont nettement séparés, une seule tâche apparaissait, de R_f inférieur à celle du témoin α -DNP-arginine ; aucune coloration avec le réactif de Sakaguchi. (l' ϵ -DNP lysine peut être révélée par la ninhydrine : en l'occurrence, les aminoacides libres, contenus dans la phase aqueuse de l'hydrolysât, interféraient dans une semblable révélation.)

En conclusion, après quatre hydrolyses différentes, aucun DNP-aminoacide n'était extrait par l'éther.

L'étude chromatographique de la phase aqueuse, par deux systèmes solvants, ne démontrait que la présence de l' ϵ -mono-DNP-lysine. La réaction de Sakaguchi restait négative et confirmait l'absence d' α -DNP-arginine.

L'hormone chorale ne possède donc pas de résidu N-terminal, ou ses résidus sont incapables de réagir avec le FDNB.

RÉSIDUS C - TERMINAUX

La détermination des groupes C-terminaux joue un rôle important dans la caractérisation des protéines et la détection des impuretés.

Malgré quelques restrictions, la méthode d'analyse enzymatique basée sur l'emploi de la carboxypeptidase a été utilisée ces dernières années avec un succès considérable dans l'identification des groupements C-terminaux.

Pour que la carboxypeptidase puisse libérer des amino-acides à partir d'une protéine, il faut que le substrat protéique comporte une ou plusieurs chaînes polypeptiques ouvertes, que la liaison C-terminale soit accessible à l'enzyme, et qu'elle soit conforme aux exigences de la spécificité de la carboxypeptidase (NEURATH et coll. 1954) [150].

La douceur de la réaction, la faible quantité de substance requise et la facilité d'identification des acides aminés libérés sont les avantages de cette technique qu'aucune méthode chimique n'est capable d'égaliser.

Seules la proline, l'hydroxyproline, la cystine et la cystéine n'ont pas encore été obtenues comme produits de réaction (GREEN et NEURATH 1954) [151].

Il ne semble pas qu'une étude des résidus C-terminaux ait déjà été entreprise sur l'hormone chorale.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

1) *Réaction enzymatique.* L'enzyme utilisé était une suspension de carboxypeptidase trois fois cristallisée (Worthington). L'activité des endopeptidases pouvant le contaminer, était inhibée par addition de diisopropylfluorophosphate (DFP) qui est sans effet sur l'activité de la carboxypeptidase (JANSEN et coll. 1948) [152] — 0,2 ml de la suspension de carboxypeptidase sont repris par 10 ml d'une solution à 1 % de bicarbonate de Na. On ajoute de la soude normale jusqu'à dissolution. Le pH est ensuite ramené à 8 par HCl N. On traite alors par 0,1 ml d'une solution de DFP 0,1 M dans l'isopropanol sec (BDH), en agitant durant une heure à température ambiante (FRAENKEL-CONRAT et coll. 1955) [153].

La vitesse de libération des aminoacides étant très variable, il importe d'effectuer l'hydrolyse durant des temps différents. L'étude de la variation de l'activité biologique sous l'action de cet enzyme nous ayant montré, par ailleurs, qu'au bout de six heures, l'activité résiduelle n'était que de 15 %, nous avons fixé comme durées de réaction une heure et trois heures.

— 20 mg d'hormone sont repris par 10 ml d'eau bidistillée. Après une dialyse de 18 heures (ceci dans le but d'éliminer les aminoacides libres ou les polypeptides de faible poids moléculaire pouvant éventuellement contaminer l'hormone), la solution de protéine est ajustée à pH 8 par la soude. Il ne semble pas indispensable de tamponner le substrat, car le pH ne change pas de façon appréciable durant la réaction en tube scellé. D'ailleurs un pouvoir tampon limité est conféré par le bicarbonate de Na contenu dans la solution d'enzyme. Le substrat est alors partagé en deux volumes égaux, correspondant ainsi à 10 mg d'hormone. On y ajoute 0,5 ml de la solution d'enzyme (rapport enzyme/substrat = 1/50). On abandonne en tube scellé à température ambiante. La réaction est arrêtée au bout des temps prévus, en précipitant la protéine par 5 volumes d'acétone froid. Après centrifugation des précipités les surnageants sont évaporés à sec. Les résidus ainsi obtenus, contenant un peu de sel, sont extraits par l'acétone chlorhydrique (100 ml d'acétone pour 1 ml d'HCl concentré, BOULANGER et BISERTE 1949) [154], et les extraits acétoniques sont évaporés au dessiccateur sur potasse jusqu'à élimination de HCl.

2) *Identification des amino-acides libérés.* Une chromatographie exploratrice est effectuée sur papier Whatman n° 1, dans le système solvant butanol-acide acétique-eau (4/1/5). Un deuxième mélange est utilisé : le phénol saturé d'eau à 0,1 % d'ammoniaque, l'atmosphère de la cuve étant constituée par la phase aqueuse saturée de phénol, amené à 0,6 % de NH₃, chromatographie descendante avec écoulement continu durant 60 heures (POLSON 1948) [155]. Les chromatogrammes sont révélés par la ninhydrine.

Afin de confirmer les résultats ainsi obtenus, une partie de l'extrait acétonique est traité par le fluorodinitrobenzène, qui transforme ainsi les amino-acides libérés en DNP-amino-acides (l'extrait acétonique est repris par l'eau distillée contenant CO₂HNa. On y ajoute le FDNB en solution alcoolique. Après deux heures d'agitation à température ambiante, on extrait par l'éther le FDNB en excès. La solution étant alors acidifiée par HCl, une extraction éthérée permet de séparer les DNP-amino-acides hydrosolubles et éthersolubles. Les deux phases, aqueuse et éthérée, sont évaporées à sec).

L'identification des DNP-amino-acides s'effectue par une chromatographie descendante de 15 heures dans le tampon phosphate 1,5 M de pH 6, en présence de témoins.

RÉSULTATS

La chromatographie dans le système butanol montre, que ce soit après une heure ou après trois heures d'hydrolyse, la présence d'une tache unique, située au niveau de la tache sérine-glycocolle. Cette tache pourrait représenter également l'arginine et l'acide aspartique, dont les Rf sont proches dans ce mélange solvant.

La chromatographie dans le phénol saturé d'eau ammoniacale permet une excellente séparation de ces quatre amino-acides, dont les Rf sont alors : acide aspartique 0,12, sérine 0,33, glycocolle 0,40, arginine 0,89.

Dans les conditions décrites plus haut, avec une feuille de 45 cm, le témoin glycocolle est à l'extrémité de la feuille, nettement séparé de la sérine. L'analyse du produit de la réaction enzymatique montre alors la présence d'une seule tache située au niveau du glycocolle.

Cette première constatation devait être vérifiée grâce à la dinitrophénylation. En effet, d'une part la phase aqueuse ne contient aucun DNP-amino-acide, d'autre part, on constate sur la chromatographie de la phase éthérée dans le tampon phosphate, une tache unique au niveau du témoin DNP-glycocolle (la DNP-sérine et le DNP-acide aspartique ont des Rf nettement supérieurs, et sont par suite bien séparés) (fig. 19).

Le Dinitrophénol, produit par l'hydrolyse alcaline du FDNB lors de la dinitrophénylation (pH 9), qui se trouverait au voisinage du DNP-glycocolle dans ce solvant, avait été éliminé par sublimation sous vide à 60°.

Ainsi, l'action de la carboxypeptidase, traitée par le DFP, libère de l'hormone choriale le glycocolle dont l'identification est effectuée par chromatographie sur papier, soit directement, soit après dinitrophénylation, sous forme de DNP-glycocolle.

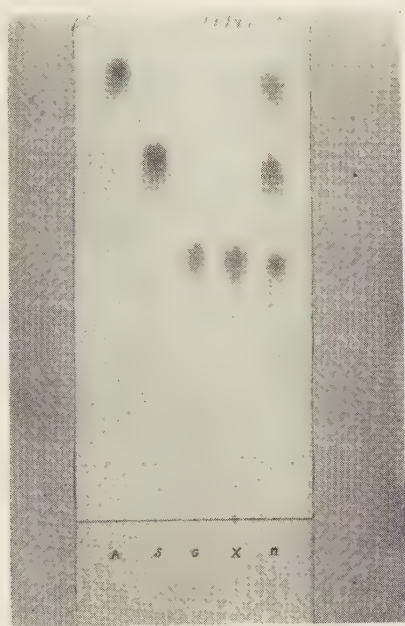


Fig. 19. — Chromatographie du résidu C-terminal dinitrophénylé de l'hormone choriale, dans le tampon phosphate.

Témoins : A = DNP-acide aspartique.

G = DNP-glycocolle.

S = DNP-sérine.

M = mélange des trois témoins.

Inconnu : X = résidu C — terminal dinitrophénylé.

On peut en conclure que l'hormone possède le glycocolle pour amino-acide C-terminal.

COPULE GLUCIDIQUE

L'hormone chorionique humaine est une glycoprotéine, comme toutes les gonadotropines ; le groupement prosthétique de cette hormone est donc essentiel à sa caractérisation, qui aurait été incomplète sans une étude de la copule glucidique.

D'ailleurs, le faible taux d'azote (10,5 %) montre l'importance de cette copule.

Si en 1931 FISCHER et ERTEL [156] trouvaient une similitude entre leur préparation et l'ovomucoïde, MEYER, en 1937 [157], confirmait la présence d'hexosamine et de sucres réducteurs dans des préparations purifiées (plus de 1.000 unités Friedman par mg). GURIN et coll. (1939) [158] parvenaient aux mêmes conclusions, avec des préparations titrant 4.000 unités Friedman par milligramme.

L'identification des hexoses dépendait de méthodes colorimétriques permettant de les différencier. HARTMANN et BENZ (1938) [159] employant la technique à l'orcinol de SORENSEN et HAUGAARD (1933) [160], conclurent à la présence de galactose ou de mannose, ou d'un mélange des deux.

Par la méthode au carbazole de DISCHE (1930) [161], modifiée par GURIN et HOOD (1939) [162], l'hexose présent fut identifié comme étant le galactose (GURIN et coll. 1939, 1940) [163], avec des pourcentages de 10 à 11 % de galactose, de 5 à 6 % d'une hexosamine non identifiée, et un rapport hexose/hexosamine de 2/1.

ZILLIACUS et ROOS (1951) [164] confirmaient ces résultats, l'hexosamine étant la glucosamine.

Plus récemment, MORRIS et MORRIS (travail non publié, cf. MORRIS 1955) [165] trouvaient des concentrations sensiblement identiques à celles-ci sur une préparation hautement active, mais non homogène.

Enfin, en 1954, KLUNGSOYR et STOA [166], utilisant la chromatographie sur papier pour comparer une substance titrant 5.000 UI/mg et une mucroprotéine extraite de l'urine mâle, trouvaient galactose, mannose, glucosamine et un autre sucre non identifié.

La présence de fucose dans les glycoprotéines a été montrée récemment (DISCHE et OSNOS 1952, WALDRON 1952) [167]. Cependant, aucune détermination n'a encore été effectuée sur l'hormone chorale.

Quant à l'acide sialique, qui tire son nom d'un corps isolé de la mucine sous-maxillaire de bœuf par BLIX en 1936 [168] (dénomination qui s'applique d'ailleurs à plusieurs substances de propriétés voisines), il entre dans la composition de nombreux glycoprotéides. Aucun travail de recherche de l'acide sialique dans l'hormone chorionique humaine ne semble avoir été publié (*).

Les connaissances que l'on possède de la copule glucidique sont donc très incomplètes ; les méthodes nouvelles d'analyse biochimique devaient permettre de les préciser.

L'étude du groupement prosthétique comporte le dosage des différents constituants, et leur identification par chromatographie sur papier, après une étude cinétique de l'hydrolyse.

Le plan de cette étude est ainsi défini.

I. — TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

1) METHODES ANALYTIQUES. — a) *Hexoses*. Il existe de nombreuses méthodes de dosage des hexoses. Certaines mettent à profit les réactions colorées qu'ils donnent avec l'orcinol. La méthode employée (cf. WINZLER 1955) [169] est une modification par WEIMER et MOSHIN (1952) [170] de la méthode de LUSTIG et LANGER (1931) [171].

(*) Signalons, cependant, que l'inactivation de l'hormone par le virus de l'influenza ou par le « receptor destroying enzyme » (WHITTEN W.K., Australian J. Sci. Research, **B1**, 388, 1948 ; KRADOLFER F., SCHAR B. et MEIER R., Experientia, **8**, 145, 1952) avait été interprétée comme indiquant la présence d'acide sialique.

Enfin, en terminant ce travail, nous avons eu connaissance d'une publication rapportant la présence d'acide sialique dans les gonadotropines urinaires (BROSSMER R. et WALTER K., Klin. Wochschr., **36**, 925, 1958). Malheureusement, les préparations étudiées, étant impures, contenaient une forte proportion de mucoprotéines inactives.

A 1 ml de la solution de glycoprotéine (contenant environ 100 μg d'hexoses), on ajoute 8,5 ml du réactif à l'orcinol (160 mg d'orcinol dissous dans 10 ml d'eau + 75 ml d'acide sulfurique Merck à 60 %). Les tubes rodés sont bouchés pour éviter l'évaporation, agités et placés au bain-marie à 80° pendant 15 minutes. Après refroidissement sous l'eau courante, la densité optique est mesurée à 540 m μ . Un blanc H₂O et une gamme de référence allant de 50 à 200 μg d'un étalon galactose-mannose est préparée en même temps. Les densités optiques varient avec les différents hexoses ; les glycoprotéines contenant en général des quantités sensiblement équivalentes de galactose et de mannose, il est donc logique de doser les hexoses totaux par rapport à un mélange équimoléculaire de galactose et de mannose.

Une autre technique employée fut celle de SOMOGYI (1945) [172] qui permet, d'une part de doser tous les sucres réducteurs, et d'autre part, d'étudier la libération des sucres au cours d'une hydrolyse, car cette méthode ne comporte pas elle-même d'hydrolyse, comme la méthode à l'orcinol-sulfurique.

Les réactifs utilisés pour ce dosage étaient les suivants :

Réactif cupro-alcalin :

A) solution de sulfate de cuivre à 15 % ;

B) solution alcaline : carbonate de sodium anhydre 25 g ; carbonate acide de sodium 20 g ; tartrate sodico-potassique 25 g ; eau distillée q.s.p. 1.000 ml ;

C) solution préparée extemporanément :

Réactif A 1 volume + réactif B 25 volumes.

Solution d'arséno-molybdate : 25 g de molybdate d' NH_4 pulvérisé sont dissous dans 450 ml d'eau distillée. On ajoute 25 ml d'acide sulfurique concentré et 25 ml d'une solution à 12 % d'arséniate de sodium cristallisé. La solution obtenue est maintenue à 37° pendant 48 heures, puis centrifugée pour éliminer le précipité. Ce réactif se conserve en flacon brun rodé, à l'abri de la lumière. Le mode opératoire était le suivant :

A 1 ml de la solution à titrer (hydrolysats neutralisés contenant 50 à 100 μg de sucres réducteurs), on ajoute 1 ml du réactif cupro-alcalin. Après 20 minutes au bain-marie bouillant (tubes rodés), on refroidissait, puis on ajoutait 1 ml de la solution d'arséno-molybdate. On agitait et complétait à 10 ml par H₂O distillée. La lecture se faisait à 500 m μ pour les fortes concentrations et à 660 m μ pour les faibles concentrations.

Des solutions étalons des différents sucres servaient de référence. Il était tenu compte du pourcentage de réduction, qui est de 100 % pour les hexoses, de 106 % pour les hexosamines, et de 66 % pour le fucose.

b) *Méthylpentoses*. La technique employée est celle de DISCHE et SHETTLES (1958) [173], qui donne des résultats reproductibles.

A 1 ml de la solution d'hormone (contenant environ 20 μg de méthylpentose) sont ajoutés, dans un bain de glace fondante, 4,5 ml d'un mélange de six volumes de SO_3H_2 concentré plus un volume d'eau. On agite, et on met exactement trois minutes au bain-marie bouillant. On refroidit sous eau courante, puis on ajoute 0,1 ml d'une solution à 3 % de chlorhydrate de cystéine. On abandonne 90 minutes à température ambiante, puis on lit au spectrophotomètre à 396 et 430 m μ , contre de l'eau distillée.

Un blanc H₂O et un étalon fucose (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sont préparés dans les mêmes conditions.

La détermination des densités optiques à deux longueurs d'onde s'explique par la correction nécessaire de la coloration produite par les autres sucres. En effet, la différence $D_{396} - D_{430}$ est nulle pour les hexoses, alors qu'elle est peu différente de D_{396} pour les méthylpentoses, car D_{430} est, dans ce cas, presque nulle.

La formule suivante est appliquée :

$$\frac{(D_{396} - D_{430}) - (D_{bl_{396}} - D_{bl_{430}})}{D_{cyst} - D_{cyst_{430}}} \times 20 = \mu\text{g fucose/ml.}$$

c) *Hexosamines*. La technique de dosage employée était basée sur la méthode d'ELSON-MORGAN (1933) [174], modifiée par RIMINGTON (1940) [175].

A 1 ml de l'hydrolysats neutralisé par la soude (une trace de phénolphtaléine permettait d'aller jusqu'au virage, pH 8,5 : on revenait alors à la décoloration par une goutte d'HCl N/10, restant ainsi dans le milieu légèrement alcalin nécessaire à la réaction d'acétylation), contenant environ 100 μg d'hexosamine, on ajoute 1 ml du réactif à l'acétylacétone (1 ml d'acétylacétone dans 50 ml de CO_2Na_2 0,5 M). Après mélange, on place les tubes au bain-marie bouillant durant 15 minutes. Après refroidissement, on ajoute 5 ml d'éthanol à 95 %. On mélange, puis on additionne de 1 ml du réactif d'Ehrlich (800 mg de p-diméthylaminobenzaldéhyde dissous dans 30 ml de méthanol + 30 ml d'acide chlorhydrique concentré). On complète à 10 ml par l'éthanol à 95 %. On agite et on abandonne 30 minutes à l'obscurité. La lecture se fait à 530 m μ .

En même temps, on prépare un blanc H₂O et une gamme de référence allant de 50 à 150 μg de glucosamine (la glucosamine et la galactosamine donnent la même courbe dans les conditions décrites. Le choix de glucosamine comme étalon est donc justifié).

d) *Acide sialique*. Les acides sialiques présentent plusieurs réactions colorées caractéristiques qui sont mises à profit pour leur dosage. Deux techniques furent utilisées :

(1) La méthode à l'orcinol-acide chlorhydrique (KLÉNK et coll. 1941) [176]. A 1 ml de la solution à doser, contenant 40 à 60 μg d'acide sialique, on ajoute 1 ml du réactif à l'orcinol (orcinol 0,15 g, HCl concentré 50 ml, FeCl_3 à 10 % 20 à 30 gouttes). On met au bain d'huile à 142° pendant cinq minutes. Après refroidissement, la coloration est extraite par agitation avec 5 ml d'alcool iso-amylique. La couche alcoolique est séparée par centrifugation, et l'intensité de la coloration est déterminée à 570 m μ .

Une gamme allant de 25 à 75 μ g d'acide sialique sert de référence. Ce dosage, quoique nous ayant donné des résultats convenables, fut abandonné au profit du suivant, plus simple à exécuter.

(2) Réaction de Dische à la diphenylamine (WERNER et ODIN 1952, MONTREUIL 1957) [177] : la prise d'essai, de 1 ml (contenant 60 μ g d'acide sialique) est chauffée pendant 30 minutes au bain-marie bouillant, avec 3 ml d'acide trichloracétique à 5 % et 6 ml du réactif à la diphenylamine (diphenylamine 1 g, acide acétique glacial 90 ml, acide sulfurique Merck 10 ml). On obtient ainsi une coloration bleu-violet que l'on mesure à 530 m μ . On se rapporte à une courbe de référence réalisée en même temps.

L'étalon utilisé était l'acide N-acétylneuraminique, préparé à partir du sérum humain (MARTENSON et coll. 1958) [178], aimablement fourni par SVENNERHOLM. Les deux dosages donnaient des résultats identiques.

2. HYDROLYSE. — a) *Sucres réducteurs*. L'étude cinétique de l'hydrolyse des sucres réducteurs a été effectuée selon le procédé suivant : 10 mg d'hormone étaient dissous dans 10 ml d'acide chlorhydrique (Fixanal) N et 2N. La faible concentration en hormone permettait d'éviter en partie la formation de substance humique. Pour chaque concentration en acide, 5 ampoules de 2 ml étaient remplies et scellées, et mises au bain-marie bouillant ; les ampoules étaient prélevées une à une aux intervalles de temps prévus, leur contenu était centrifugé pour éliminer les traces d'humines. Un millilitre du surnageant servait au dosage des hexosamines et 0,5 ml au dosage des sucres réducteurs totaux.

b) *Acide sialique*. La libération des acides sialiques à partir des glycoprotéines s'effectue par des hydrolyses douces. Nous avons suivi le mode opératoire préconisé par SVENNERHOLM (1956) [179], et appliqué par YAMASHINA (1956) [180] à l'orosomucoïde humain.

50 mg d'hormone sont dissous dans 10 ml d'eau distillée ; on ajoute 10 ml d'acide sulfurique N/50, soit, en définitive, une normalité au 1/100. On hydrolyse une heure à 100° en tube scellé. Après neutralisation par NaOH N (la neutralisation par la baryte nous aurait empêchés de récupérer la protéine hydrolysée), la protéine est précipitée par 5 volumes d'alcool.

Un dosage d'acide sialique est effectué sur le surnageant et sur le précipité.

3. CHROMATOGRAPHIE. — a) *Sucres réducteurs*.

A) Analyse qualitative : l'identification des substances glucidiques a été réalisée par chromatographie descendante, sur papier, dans les systèmes-solvants suivants :

n-butanol/acide acétique/eau (4/1/5), 72 heures (PARTRIDGE 1948) [181].

Acétate d'éthyle/pyridine/eau (2/1/2), 24 heures (JERMYN et ISHERWOOD 1949) [182].

Alcool iso-amylque/pyridine/eau (7/7/6), 30 heures (COURTOIS 1956) [183].

n-butanol/pyridine/eau ou n-butanol/pyridine/HCl N/10 (5/3/2), 16 heures (BOURRILLON et MICHON 1958) [184].

— Ce solvant permettait de séparer les oses neutres et les osamines trouvés dans les glycoprotéines.

Les papiers utilisés étaient : Whatman 1 et Schleicher 2043 B lavé aux acides.

La révélation était effectuée par les réactifs suivants :

L'oxalate d'aniline (acide oxalique 0,1N : 100 ml + aniline 0,9 ml) qui met en évidence les oses neutres et aminés.

Le réactif d'EHRlich, spécifique des osamines et de leurs dérivés acétylés.

De plus, en lumière UV, après une heure de chauffage à 80° on voit apparaître des taches à fluorescence bleutée au niveau des osamines. Cette révélation est sensibilisée lorsqu'on soumet, au préalable, le papier à une pulvérisation par CO₂Na₂ M.

Des solutions de substances témoins étaient chromatographiées dans les mêmes conditions.

B) Analyse quantitative : la technique suivie est celle préconisée par BOURRILLON et MICHON (1958) [185], dont voici le procédé opératoire :

Le système-solvant était : n-butanol/pyridine/HCl N/10 (5/3/2), et le papier : Schleicher 2043 B lavé aux acides. Avec une micropipette étalonnée, on dispose sur la ligne de départ du chromatogramme, tracée à 9 cm du bord de la feuille, un volume exactement mesuré (1/100 de ml) de l'hydrolysat (évaporé à sec pour en chasser l'acide chlorhydrique, et repris par l'eau distillée), sur une longueur de 1 cm. De part et d'autre de l'échantillon à étudier, on dépose des solutions de référence contenant les mêmes substances glucidiques, en concentrations respectives aussi voisines que possible de celles de l'échantillon. Il est donc nécessaire de faire une chromatographie préliminaire pour apprécier l'ordre de grandeur des différents glucides présents.

Après développement en chromatographie descendante (durée 16 heures à 22° + 2°), le papier est séché deux heures à température ambiante, puis une demi-heure à 80° pour éliminer les dernières traces de solvant. Les deux bandes latérales de référence et une bande correspondant à l'hydrolysat sont révélés par l'oxalate d'aniline : au niveau de chaque tache témoin, on découpe, sur la bande centrale à étudier, des carrés de papier englobant les taches inconnues. Celles-ci sont éluées par 3 ml d'eau distillée, durant une nuit, en glacière.

Connaissant l'identité de chaque tache, grâce aux bandes témoins, on leur applique la technique de dosage correspondante : Elson-Morgan pour les osamines, et Somogyi pour les oses. Les résultats sont obtenus par rapport à des courbes d'étalonnage réalisées pour chacune des substances glucidiques. Les dosages sont effectués sur trois à cinq bandes, la moyenne étant prise comme valeur définitive.

b) *Acide sialique*. Après précipitation de l'hydrolysat, le surnageant est évaporé à sec, repris par l'eau et passé sur une colonne échangeuse de cations Amberlite IR 120, de 2×18 cm, ayant subi le cycle $\text{HCl N} - \text{H}_2\text{O} - \text{NaOH N}$, laissée sous la forme hydrogène et lavée jusqu'à ce que le pH de l'eau de lavage atteigne 5. Le passage est suivi d'un lavage par 300 ml d'eau. L'effluent ainsi constitué est concentré sous vide. Une partie aliquote est chromatographiée (chromatographie descendante avec écoulement durant trois jours sur papier Whatman N° 1 dans le système-solvant butanol/acide acétique/eau, 4/1/5, ou durant 30 heures sur papier Schleicher 2043 B, dans le mélange butanol/pyridine/HCl N/10, 5/3/2). Le révélateur utilisé est celui de KLEVSTRAND et NORDAL (1950) [186] : orcinol 5 g, acide trichloracétique 15 g, eau saturée de butanol 100 ml — 5 minutes à 110° .

Le reste de l'effluent de l'Amberlite IR 120 est repris par l'acide formique N/10, et passé sur une colonne de Dowex 2 ($27 \times 0,8$ cm — tamis 80) traitée par l'acide formique normal, l'eau puis l'acide formique 0,1 N. Des fractions de 3 ml sont recueillies à la sortie de la colonne, 30 pour l'effluent acide formique 0,1 N et 30 également pour l'éluat acide formique 0,3 N.

Après dosage pour leur concentration en acide sialique, les fractions les plus concentrées sont réunies et chromatographiées, selon la même technique que précédemment.

Deux témoins, aimablement fournis par SVENNERHOLM, étaient utilisés : l'acide N-acétylneuraminique humain et un mélange d'acide N-acétyl et d'acide N-glycolyl-sialique d'origine bovine.

II. — RÉSULTATS

1. MÉTHODES ANALYTIQUES

Les résultats sont réunis dans le Tableau XXIV.

TABLEAU XXIV

Pourcentage des différentes substances glucidiques contenues dans la gonadotropine chorale.

Composés glucidiques	Pourcentage
Hexoses	11
Fucose	1,2
Hexosamines	8,7
Acide sialique	8,5

(Ces résultats représentent la moyenne de plusieurs séries de dosages. Les valeurs obtenues par le dosage des méthylpentoses ont été rapportées au fucose, car seule la présence de fucose a été montrée.)

Ainsi, la présence déjà signalée d'hexoses et d'hexosamines est confirmée. Cependant, si le pourcentage d'hexose est en accord avec les chiffres antérieurs, il

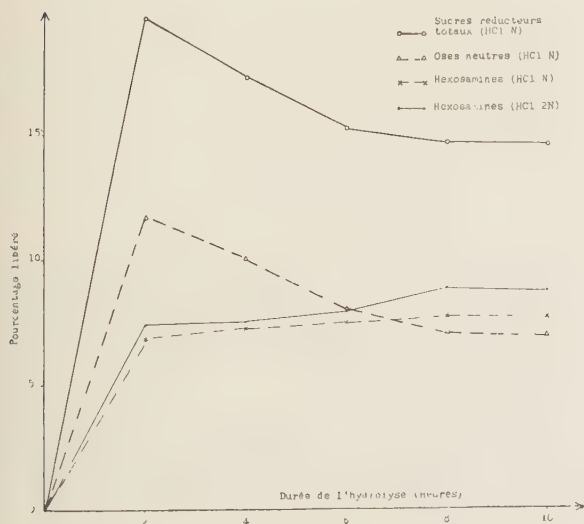


Fig. 20. — Libération des sucres réducteurs en fonction du temps, par action de l'acide chlorhydrique N et 2 N.

faut noter que la quantité d'hexosamines présentes dans cette hormone est nettement supérieure aux quantités trouvées précédemment, le rapport hexose sur hexosamine n'étant plus égal à 2, mais à 1,26.

Signalons enfin la présence de fucose et d'acide sialique montrée pour la première fois dans cette gonadotropine, et que la chromatographie sur papier va confirmer.

2. HYDROLYSES. — a) *Sucres réducteurs*. Dans une publication récente, MICHON et BOURRILLON (1958) [187] ont de nouveau attiré l'attention sur l'importance de l'hydrolyse des glycoprotéines, en réalisant une étude cinétique avec les acides sulfurique et chlorhydrique à différentes concentrations. Ils concluaient que, dans des conditions parfaitement contrôlées, l'acide chlorhydrique est supérieur à SO_4H_2 et permet une libération totale des oses et des osamines.

C'est pourquoi une étude cinétique de l'hydrolyse de l'hormone a été réalisée avec HCl N et 2 N.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau XXV et schématisés sur la figure 20.

TABLEAU XXV

Pourcentage des sucres réducteurs libérés en fonction du temps par HCl N et HCl 2 N.

Durée de l'hydrolyse	HCl N		HCl 2 N	
	Sucres réducteurs totaux	Hexosamines	Sucres réducteurs totaux	Hexosamines
2 heures	19,6 %	6,9 %	10 %	7,4 %
4 —	17,2 %	7,2 %		7,5 %
6 —	15,2 %	7,4 %		7,9 %
8 —	14,7 %	7,7 %		8,8 %
10 —	14,6 %	7,7 %		8,6 %

(Le pourcentage d'oses neutres libérés est obtenu par différence entre le pourcentage des sucres réducteurs totaux et celui des hexosamines. On remarque la chute de ce pourcentage après deux heures d'hydrolyse.)

Ces résultats entraînent les constatations suivantes :

1° Les hexoses sont libérés rapidement par l'acide chlorhydrique normal, mais une destruction intervient dès la quatrième heure d'hydrolyse, destruction presque totale avec l'acide 2 N ;

2° Par contre, la libération totale des hexosamines ne se produit que sous l'action d'acide 2 N, après au moins huit heures d'hydrolyse.

Aussi, pour l'analyse chromatographique quantitative, doit-on pratiquer deux sortes d'hydrolyse : une de 2 heures dans HCl N pour les oses, une autre de huit heures dans HCl 2N pour les osamines (pour l'analyse qualitative, une seule hydrolyse de deux heures dans HCl N suffisait).

b) *Acide sialique*. Après hydrolyse, on retrouve dans le surnageant 94 % de l'acide sialique initial, qui est, ainsi, pratiquement libéré en totalité.

3. CHROMATOGRAPHIE. — a) *Sucres réducteurs*. La présence des substances suivantes est montrée : fucose, mannose, galactose et deux osamines.

En effet, dans les cinq solvants utilisés, les oses neutres migrent exactement comme le fucose, le mannose et le galactose témoins. La présence du fucose est confirmée par la réaction de DISCHE à la cystéine effectuée sur l'éluat de la tache correspondante. Les hexoses étaient caractérisés par la coloration brune des taches, après révélation par l'oxalate d'aniline.

L'identification des osamines est beaucoup plus délicate. En effet, dans les solvants acides, les osamines se dédoublent ou donnent des trainées : le système de Partridge était donc inutilisable. Par contre, les osamines migrent bien dans les solvants pyridiniques, mais seul le système-solvant butanol/pyridine/HCl N/10 (5/3/2) permet la séparation de deux osamines. La galactosamine et la glucosamine

témoins migrent, dans ce cas, exactement comme les deux osamines de l'hydrolysât, qui sont caractérisées par la révélation à l'oxalate d'aniline, au réactif d'Ehrlich et par la fluorescence.

La figure 21 est un cliché d'une chromatographie effectuée dans ce solvant sur un hydrolysât HCl N (deux heures).

On constate la présence certaine de deux hexosamines (la glucosamine étant en plus forte proportion), de deux hexoses (galactose et mannose en quantité sensiblement identique) et de fucose (en faible quantité, mais dont la tache bien détachée est parfaitement nette).

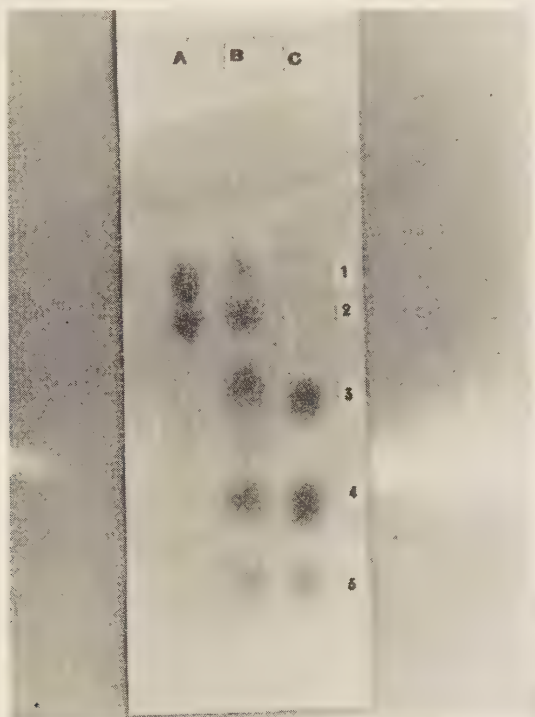


Fig. 21. — Chromatographie des sucres réducteurs totaux dans le système-solvant butanol/pyridine/HCl N/10 (5/3/2).

A : Témoins hexosamines. 1 = galactosamine.
2 = glucosamine.

C : Témoins oses. 3 = galactose. 4 = mannose.
5 = fucose.

B : Hydrolysât.

L'analyse quantitative des éluats correspondant à chaque tache, devait préciser ces premières constatations. Le Tableau XXVI donne la moyenne de plusieurs séries d'expériences. Les chiffres obtenus ont été rapportés à 100 μ g d'oses neutres ou d'osamines.

Ces résultats entraînent les remarques suivantes :

Si la récupération des osamines et du fucose est toujours quantitative, au contraire, dans le cas des hexoses, une fraction non négligeable fait régulièrement défaut. La zone de départ de la chromatographie fut élue : le dosage permettait d'y retrouver la totalité des hexoses manquants. Après une nouvelle hydrolyse subie par cet éluat, durant deux heures dans l'acide chlorhydrique normal, une chromatographie montrait la présence du galactose et du mannose qui n'avaient pas été totalement libérés par une première hydrolyse.

TABLEAU XXVI

Analyse quantitative des oses neutres et aminés.

Oses neutres 100 μ g		Osamines 100 μ g	
Galactose	29	Galactosamine	18
Mannose	30	Glucosamine	76
Fucose	11		
Total		Total	94

D'autre part, cette méthode d'analyse a permis de déterminer les rapports molaires des différents glucides : le rapport mannose/galactose est égal à 1. Ce résultat devait être confirmé par la technique de BRUCKNER (1951) [188]. Le spectre de l'hormone entre 390 et 550 m μ , après action du réactif à l'orcinol (2 minutes à 100° dans l'acide sulfurique à 72 %), était sensiblement identique à celui du mélange équimoléculaire galactose-mannose.

Le rapport glucosamine/galactosamine est de 4.

Enfin, en rapportant les pourcentages ainsi obtenus au poids moléculaire de l'hormone, on a pu déterminer le nombre de résidus de chacun des composés, contenus dans la molécule.

On obtient donc : 18 hexoses, soient 9 galactoses et 9 mannoses.

15 hexosamines, soient 12 glucosamines et 3 galactosamines.

2 fucoses.

b) *Acide sialique*. Après passage sur Dowex 2, on ne retrouve pas d'acide sialique dans l'effluent. Par contre, le dosage, effectué sur les fractions de l'éluat, en montre la présence dans les fractions 9 à 17, avec une concentration maximum dans la fraction 13 (fig. 22 a).

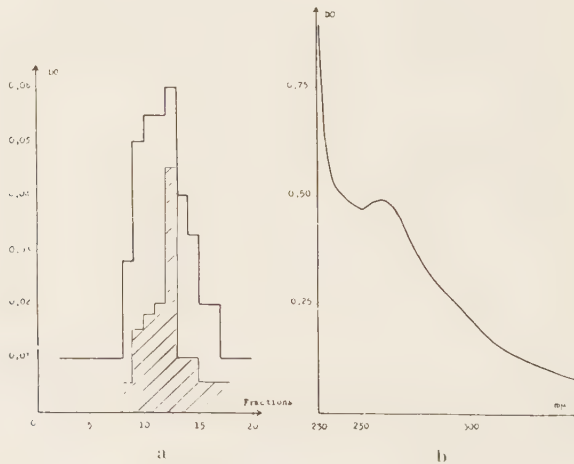


Fig. 22

a : dosage de l'acide sialique dans l'éluat du Dowex par l'acide formique 0,3 N.

(La partie hachurée correspond à la densité optique des fractions à 260 m μ .)

b : spectre dans l'U.V. des fractions 9-17.

La figure 23 est un cliché d'une chromatographie des fractions 9-17, effectuée dans le système solvant butanol/pyridine/HCl 0,1 N (5/3/2) durant 30 heures.

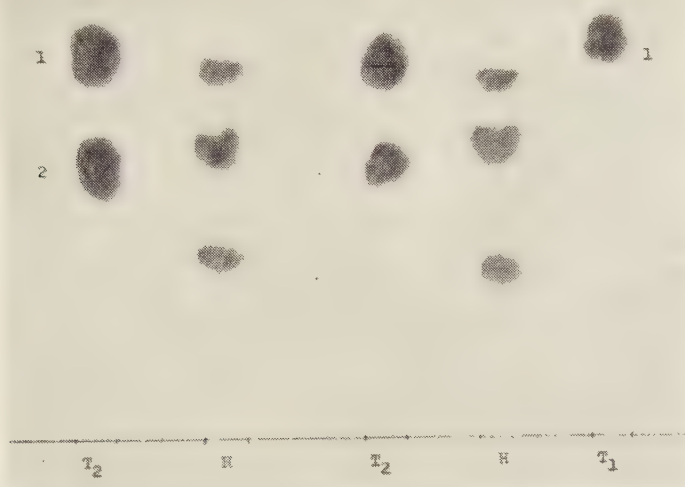


Fig. 23. — Chromatographie des acides sialiques dans le système solvant butanol/pyridine/HCl 0,1 N (5/3/2).

T₁ : témoin acide N-acétyl-neuraminique (1).

T₂ : mélange des témoins acide N-acétyl-sialique et N-glycolyl-sialique (2).

H : acides sialiques de l'hormone.

Constatons tout d'abord, la bonne résolution des deux témoins : après révélation par le réactif de KLEVSTRAND et NORDAL, deux taches violacées apparaissent, séparées par plusieurs centimètres, l'acide N-acétyl ayant un R_f supérieur.

Quant à l'hormone, elle présente une tache très nette au niveau de l'acide N-glycolyl-sialique, et une tache plus faible, mais nettement différenciée au niveau de l'acide N-acétyl. De plus, une troisième tache très légère, de R_f plus faible, apparaissait également, sans qu'on puisse l'identifier. (Ces résultats se retrouvaient dans l'autre système solvant).

Afin de confirmer la présence d'acide N-glycolyl-sialique, un dosage d'acide glycolique était effectué selon la technique de KLENK et ULHENBRUCK (1957) [189]. L'hormone était hydrolysée par l'acide sulfurique N/100, selon la technique décrite précédemment : après précipitation, le surnageant qui contenait la quasi totalité des acides sialiques, était évaporé à sec, repris par l'acide sulfurique normal, et hydrolysé pendant une heure à 100°, afin de libérer l'acide glycolique. Le dosage par le réactif d'Eegriwe (10 mg de 2-7 dihydroxynaphtalène dans 100 ml de SO₄H₂ concentré) mettait en évidence une quantité relativement importante d'acide glycolique, qui rapportée au pourcentage d'acides sialiques contenus dans l'hormone, montre que l'acide N-glycolyl-sialique représente au moins 50 % du total.

Une étude spectrophotométrique dans l'ultra-violet, effectuée sur l'éluat Dowex, présentait une bande d'absorption très marquée à 260 mμ. La densité optique des fractions 9-17 de cet éluat avait d'ailleurs été mesurée directement à 260 mμ. Le diagramme ainsi obtenu suit sensiblement celui que donnait le dosage, avec un maximum pour la fraction 13 (figure 22a, partie hachurée). Des « spots » non révélés des deux constituants séparés par chromatographie furent alors élués du papier par 10 ml de soude N/1.000 : on retrouvait dans les spectres cette bande d'absorption à 260 mμ, particulièrement nette (figure 22 b) pour le constituant situé au niveau de l'acide N-glycolyl, dont la concentration relative est de beaucoup la plus élevée.

BLIX a signalé cette bande d'absorption (1958) [190].

L'hormone choriale présenterait donc au moins deux acides sialiques, que la chromatographie permettrait d'identifier comme étant l'acide N-acétyl-sialique, et l'acide N-glycolyl-sialique, le dosage d'acide glycolique montrant que ce dernier représente au moins 50 % du mélange.

En faisant une moyenne entre les poids moléculaires de ces deux composés, on trouverait huit résidus d'acide sialique dans la molécule hormonale.

L'étude de la copule glucidique de la gonadotropine chorionique humaine a permis, grâce à l'apport de données entièrement nouvelles, de préciser la connaissance de cette partie primordiale de la molécule.

Si la présence de galactose et de mannose déjà signalée a été vérifiée, on a pu déterminer leur proportion relative.

Un méthylpentose, le fucose, a, pour la première fois, été dosé et identifié par chromatographie.

Quant aux hexosamines, on a, certes, confirmé la présence de glucosamine, mais, par surcroît, on a pu montrer l'existence de galactosamine et calculer sa concentration. Il faut ajouter que, contrairement à ce qui était généralement admis, le rapport hexose/hexosamine n'est pas égal à deux, mais à 1,26.

Pour ce qui est de l'acide sialique, non seulement son pourcentage a été déterminé, mais la chromatographie sur papier a révélé la dualité de ses constituants, qui migrent l'un comme l'acide N-acétyl-sialique, l'autre, le plus important, comme l'acide N-glycolyl-sialique.

Le poids moléculaire de l'hormone étant connu, le nombre de résidus de chaque constituant a pu être calculé.

Notons également l'étude cinétique de l'hydrolyse, qui a montré une destruction rapide des hexoses, si les conditions d'hydrolyse sont trop drastiques.

Enfin, il importe de signaler que tous les composés glucidiques de cette copule ont été dosés par deux techniques différentes : la bonne concordance entre les résultats apporte une garantie supplémentaire quant à leur valeur.

STABILITÉ

Le problème de la stabilité peut être envisagé sous différents aspects, selon que l'on considère les modifications survenues dans les propriétés physiques, chimiques ou biologiques des protéines. Puisque nous avons à faire à une hormone, il est logique de se préoccuper essentiellement des variations d'ordre physiologique, c'est-à-dire des pertes éventuelles d'activité biologique.

Si l'étude de la stabilité de l'hormone en solution présente un intérêt certain, les résultats obtenus après l'action d'enzymes variés sont, sans doute, de plus grande portée. En effet, il est tentant, partant d'une macromolécule biologiquement active, d'isoler un noyau polypeptidique qui, seul, retiendrait cette activité. L'exemple le plus spectaculaire, celui de l'A.C.T.H., peut-il être généralisé ? En d'autres termes, dans le cas de la gonadotropine chorionique, est-il possible de retrouver l'activité gonadotrope sur une fraction de faible poids moléculaire ?

La littérature nous offre quelques résultats, dans ce domaine, mais, anciens et souvent contradictoires, ils portaient sur des préparations très impures.

L'hormone est stable à l'état sec : SCHOOLEY (1943, travail non publié, cf. GURIN 1944) [191] gardait des fractions purifiées pendant des temps assez longs au dessiccateur, à température ambiante. Le maintien ou la perte d'activité en milieu aqueux, neutre, acide ou basique, a été étudié en fonction de divers facteurs (DICKENS 1930, GURIN et al. 1939, BISCHOFF 1946, LI 1949, MORRIS 1954) [192].

Quant à l'action des enzymes, REISS et HAUROWITZ (1929), WIESNER et MARSHALL (1931) [193] déclaraient que l'hormone était inactivée par la trypsine et non par la pepsine. Plus tard, ABRAMOWITZ et HISAW (1939) [194], observaient l'inactivation par la trypsine cristallisée, par une préparation salivaire, par la chymotrypsine et par la papaïne. Enfin, récemment, BEARD (1957) [195] confirmait la destruction de l'activité par la chymotrypsine.

Ces résultats, épars, qualitatifs, ne sont pas toujours concordants. L'utilisation d'un substrat physiquement pur, d'enzymes nouveaux, l'étude cinétique quantitative, devaient nous permettre de préciser la connaissance de cette hormone.

I. — TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

1) SOLUTIONS AQUEUSES. — Solutions d'hormone à 0,1 % et 0,01 % dans le sérum physiologique ou dans l'eau distillée stérilisée, maintenues à 0°, 37° ou 65°, ou dans un milieu hydro-alcoolique à 50 %.

Les dosages sont effectués après un intervalle de temps variable, 3, 8, 15, 30 jours, et comparés à un dosage effectué en dissolvant l'hormone extemporanément.

Solutions d'hormone dans la soude N/100 (pH 12) et dans HCl N/100 (pH 2).

2) ENZYMES. — Enzymes protéolytiques : pepsine, trypsine, chymotrypsine, papaïne, carboxypeptidase (Worthington) pures, cristallisées.

Enzymes glucidolytiques : lysozyme et glucosidase purs, cristallisés (Worthington).

Préparation salivaire (ptyaline) : les préparations utilisées étaient soit de la salive humaine filtrée sur Seitz, soit une poudre acétonique obtenue à partir de ce filtrat.

Toutes les opérations sont conduites de façon stérile ; pour chaque enzyme étudié, on prépare plusieurs échantillons qui seront prélevés après des temps d'hydrolyse variables. En général, les activités biologiques sont mesurées après 1, 3, 6, 22 heures d'hydrolyse.

Le rapport enzyme/substrat est voisin de 1/50, la température égale à 37° et le pH fixé au maximum de l'activité enzymatique considérée, c'est-à-dire :

trypsine, chymotrypsine, papaïne	pH 7,5 (tampon phosphate)
carboxypeptidase	pH 8
pepsine	pH 2
glucosidase, lysozyme	pH 5,4 (tampon acétate)
ptyaline	pH 7

Au cours de ces expériences, une solution témoin de la gonadotropine est soumise aux mêmes conditions de température, de pH, de dilution, et des échantillons sont dosés, pour leur activité biologique, aux mêmes intervalles de temps que ceux des solutions soumises à l'action des enzymes. Excepté le cas de la pepsine, l'activité des tubes témoins est restée constante pendant la durée de l'expérience.

II. — RÉSULTATS

1. SOLUTIONS AQUEUSES. — Dans tous les cas, les solutions aqueuses ou hydro-alcooliques à 50 % d'alcool de l'hormone sont stables pendant trois jours à 0° ou à 37°. Des divergences se manifestent dans les cas de plus longue incubation : c'est ainsi que dans une expérience, l'activité se maintient intégralement pendant treize jours, tandis que dans une autre, utilisant la même préparation, l'activité avait chuté de plus de 50 % au huitième jour, et avait pratiquement disparu au quatorzième. Cette divergence semble pouvoir s'expliquer par le fait que dans le premier cas, la concentration était de 1 mg/ml et, dans le deuxième cas, de 0,1 mg/ml, fait déjà signalé dans la littérature, mais, à notre connaissance, non chiffré.

Enfin, après 30 jours, même avec la solution la plus concentrée, l'activité représente seulement 20 % de sa valeur initiale.

Si la température ne semble avoir aucune influence sur l'activité hormonale entre 0° et 37°, une température plus élevée provoque une inactivation complète en moins de 24 heures.

A pH acide (pH 2) et à pH alcalin (pH 12), l'activité s'effondre rapidement, puisqu'elle devient inférieure à 30 % de sa valeur initiale après un traitement de six heures à 37°.

2. ENZYMES. — L'ensemble des résultats fait apparaître une grande fragilité de l'hormone sous l'effet des différents enzymes utilisés : l'activité biologique subit toujours une chute, variable suivant le cas considéré.

Trois séries d'expériences, au moins, ont été réalisées pour chaque enzyme, avec des résultats sensiblement identiques.

a) Pepsine : l'instabilité connue de la gonadotropine en milieu acide et le pH très bas d'activité de la pepsine excluaient d'avance une réponse à l'action de cet enzyme. De fait, la chute rapide de l'activité biologique que l'on observe également dans le témoin ne peut être imputée à la pepsine.

b) Trypsine, chymotrypsine et papaïne : malgré leur spécificité différente, ces trois enzymes apportaient des résultats voisins. En effet, on observe dans ces trois cas une chute régulière de l'activité biologique, dès la première heure, laquelle s'accroît en fonction du temps, et ramène l'activité à 20 % de sa valeur initiale après 24 heures.

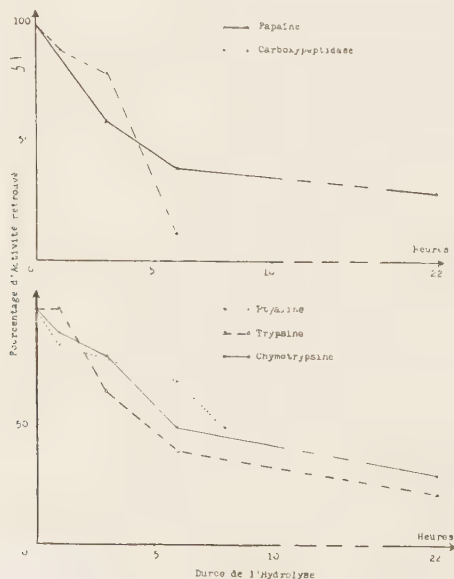


Fig. 24. — Cinétique de l'hydrolyse de l'hormone par différents enzymes protéolytiques.

c) Carboxypeptidase : cette action se révèle particulièrement intéressante, car l'activité reste intégrale pendant les trois premières heures — alors que le glyco-colle qui occupe la position C-terminale, est libéré, puis disparaît presque complètement à la 6^e heure. Il n'y a donc pas, comme précédemment, une chute lente et continue de l'activité, mais un phénomène explosif en relation avec la libération d'acides-amino sous l'effet de cet enzyme.

d) Ptyaline : la ptyaline entraîne une perte d'activité lente et incomplète, puisqu'à la huitième heure on retrouve encore 50 % de l'activité initiale. Il faut évidemment souligner dans ce cas le caractère impur de la préparation enzymatique utilisée et ne pas nier la possibilité d'actions parasites.

e) Glucosidase et lysozyme : ces deux enzymes glucidolytiques diminuent l'activité gonadotrope dans des proportions qui ne sont pas négligeables, puisqu'à la sixième heure on ne retrouve que 60 à 70 % de l'activité initiale.

L'ensemble de ces résultats est résumé dans la figure 24 et dans le tableau XXVII.

TABLEAU XXVII

Modification de l'activité biologique de la gonadotropine chorionique humaine en solution et sous l'action de différents enzymes protéolytiques et glucidolytiques.

Nature de l'action	Conditions d'expérience		Activité retrouvée en % de l'activité initiale
Etat sec	dessicateur		100 %
Solution aqueuse (1 mg/ml)	24 heures à 37°		100 %
	3 jours	—	100 %
	8	—	100 %
	13	—	100 %
	14	—	100 %
(0,1 mg/ml)	24 heures	—	100 %
	3 jours	—	100 %
	8	—	30 %
	14	—	pratiquement nulle
Tampon phosphate pH 7,2 0,1 mg/ml	24 heures à 37°		100 %
	3 jours	—	100 %
	8	—	30 %
	14	—	pratiquement nulle
Solution hydro- alcoolique 1 mg/ml	24 heures à 37°		100 %
	5 jours	—	100 %
Solution aqueuse	24 heures à 65°		néant
Solution acide	HCl N/100 6 h à 37°		30 %
Solution alcaline	NaOH N/100 6 h à 37°		30 %
Ptyaline	pH 7	37° 1 heure	85 %
—	—	6 —	79 %
—	—	8 —	50 %
Glucosidase	pH 5,4	37° 6 heures	60 à 80 %
Lysozyme	— 5,4	37° 6 —	60 %
Trypsine	pH 7,5	37° 1 heure	100 %
—	—	3 —	65 %
—	—	6 —	40 %
—	—	22 —	22 %
Chymotrypsine	pH 7,5	37° 1 heure	90 %
—	—	3 —	80 %
—	—	6 —	50 %
—	—	22 —	30 %
Papaïne	pH 7,5	37° 3 heures	60 %
—	—	6 —	40 %
—	—	22 —	30 %
Carboxypeptidase	pH 8	37° 1 heure	90 %
—	—	3 —	80 %
—	—	6 —	12 %

Ainsi, parfaitement stable à l'état sec, l'hormone voit son activité biologique subir des fortunes diverses en solution. Il résulte de notre expérimentation que les pH très acides ou alcalins, la température entraînent une chute brutale de l'activité. A un pH voisin de la neutralité et à des températures ne dépassant pas 37°, l'activité se maintient dans toutes les conditions au moins trois jours. Au delà, l'hormone conserve son potentiel intact pendant encore une douzaine de jours en solution à 0,1 %, alors qu'en solution plus diluée, l'activité a pratiquement disparu en quelques jours. L'interprétation de ces résultats est difficile : tout au plus formulerons-nous l'hypothèse qu'une hydrolyse partielle se produit libérant des substances indispensables à l'activité hormonale.

Si le rôle de la pepsine n'a pu être précisé, puisque les conditions de son activité sont incompatibles avec le maintien de l'activité biologique (il est donc surprenant que REISS et WIESNER aient pu conclure que l'hormone n'était pas inactivée par la pepsine), tous les enzymes glucidolytiques ou protéolytiques utilisés dans cette étude, dans des conditions expérimentales différentes de celles des précédents auteurs (enzymes et substrat purs), ont entraîné une destruction plus ou moins importante de l'activité. Il est alors peu vraisemblable que l'on puisse rapporter à un simple polypeptide l'activité gonadotrope.

La fragilité de cette hormone, ainsi mise en évidence, nous amène à conclure que, dans l'état actuel de nos connaissances, l'activité biologique est liée à l'intégrité de la molécule.

ANALYSE DES ACIDES AMINES

L'analyse quantitative des acides aminés a été effectuée selon la technique de MOORE et STEIN (196, 197).

Conditions de l'hydrolyse acide total :

HCl 6 N ; 110° ; 24 heures.

Résine : Amberlite CG-120.

Les amino-acides neutres et acides étaient chromatographiés, après oxydation performique, sur une colonne de 90 × 0,9 cm, les amino-acides basiques sur une colonne de 15 × 0,9 cm.

Les pourcentages obtenus sont les suivants :

CySO ₃ H.....	8,92	Ala.....	1,93
	(en cystine)	Val.....	2,83
Asp.....	3,94	Ileu.....	1,67
Met. O ₂	1,00	Leu.....	4,17
Thr.....	2,76	Tyr.....	0,96
Ser.....	4,19	Phe.....	1,37
Glu.....	4,47	Lys.....	2,35
Pro.....	2,70	His.....	0,82
Gly.....	1,51	Arg.....	2,78

(Un dosage effectué selon la technique de Spies et Chambers, montrerait qu'il y a moins de 0,6 % de tryptophane).

Quelques déterminations par une méthode microbiologique (198) ou par la méthode de Lévy (199) donnaient des pourcentages légèrement supérieurs.

Signalons qu'aucune correction n'a été apportée pour tenir compte de la destruction éventuelle des acides aminés, au cours de l'hydrolyse.

Ces dosages ont été effectués au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Paris, sous la direction de M. Pierre JOLLES. Qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude.

DISCUSSION

Voici plus de trente ans que la gonadotropine chorionique humaine a été découverte : si, durant cette période, quelques notions ont été acquises sur sa nature, il faut cependant constater que, depuis une quinzaine d'années, aucun progrès réel, aucune donnée véritablement nouvelle n'ont permis d'avancer dans la connaissance que l'on a de cette substance.

En effet, les caractéristiques physico-chimiques auxquelles on se rapporte actuellement, sont encore celles que publièrent GURIN (1940) [200] et LUNDGREN (1942) [201].

Le Tableau XXVIII résume ces données.

Parmi toutes les méthodes de purification, trois seulement avaient permis d'obtenir un produit final de haute activité, encore cette activité était-elle de l'ordre de 6.000 à 8.000 UI/mg au maximum.

Les hormones de KATZMAN et coll. (1943) [202], ou de CLAEISSON et coll. (1948) [203], qui semblent avoir été les plus actives obtenues jusqu'alors, (nous ne tenons pas compte de la préparation de MORRIS effectuée à partir d'une urine de chorionépithéliome) ont été peu étudiées sur le plan physique ou chimique.

En effet, KATZMAN décrit uniquement sa méthode de préparation, et CLAEISSON réduit son étude physique à une électrophorèse à pH 7 (force ionique 0,1), sans présenter de clichés, et à la cristallisation de son produit final, alors que la cristallisation n'est pas un critère absolu de pureté.

Il faut donc bien admettre que seuls les résultats présentés par GURIN et LUNDGREN peuvent servir de référence.

TABLEAU XXVIII

Données anciennes.

Activité (UI/mg).....	6.000 à 8.000
N (%)	12,03
C (%).....	50,42
H (%).....	6,93
Constante de Sédimentation, S_{20} (cm sec ⁻¹ dyne ⁻¹).....	$4,3 \times 10^{-13}$
Constante de diffusion, D_{20} (cm ² sec ⁻¹).....	$4,4 \times 10^{-7}$
Volume spécifique partiel (ml/g)	0,76
Poids moléculaire	100.000
Mobilité électrophorétique, pH 7, $\mu = 0,1$ (cm ² sec ⁻¹ volt ⁻¹)	— $4,8 \times 10^{-5}$
Point isoélectrique.....	3,2 — 3,3
Galactose (%).....	10,7
Hexosamine (%).....	5,2
Hexose/Hexosamine.....	2,1

D'ailleurs, il est curieux de constater cette absence d'une étude physico-chimique, même sommaire, à la suite de méthodes permettant une purification relativement avancée. Ceci peut être dû au fait que l'étude physico-chimique d'une protéine exige une quantité de produit importante, ce produit étant, évidemment le plus purifié auquel on puisse parvenir. Or, si l'hormone chorionique provient d'une source abondante et facile à obtenir, l'urine de femme enceinte, sa concentration y est faible. Il faut donc traiter des volumes considérables pour posséder les centaines de milligrammes nécessaires, après une purification dont le rendement en substance finale n'est, au mieux, que de quelques milligrammes par litre d'urine.

— Ainsi qu'il a été dit plus haut, nous n'obtenons que 700 à 1.500 μ g par litre d'urine, d'un produit titrant 10.000 à 12.000 UI par milligramme. GURIN extrayait 6 mg d'un produit titrant 6.000 UI par milligramme. Par contre, CLAEISSON prétendait obtenir 25 à 30 mg d'un produit titrant 4.000 à 6.000 UI, soient 100.000 à 180.000 UI par litre d'urine, chiffres qui semblent excessifs d'après les derniers travaux de LORAINE (1950).

Notre produit final possède une activité nettement supérieure à celles des hormones les plus pures obtenues précédemment. Or, si l'on compare notre méthode de préparation aux méthodes antérieures, celles-ci paraissent moins poussées,

leurs auteurs n'ayant pas à leur disposition les techniques modernes de purification des protéines et semblant désirer obtenir un produit hautement actif plutôt qu'une protéine définitivement pure.

Ainsi, les méthodes de GURIN ou de CLAEISSON ne mettent-elles en jeu, après l'adsorption par l'acide benzoïque, que des extractions ou des précipitations fractionnées à différents pH par les solvants organiques, ce qui ne correspondrait qu'à la première phase de notre procédé. La préparation de KATZMAN est exclusivement fondée sur une adsorption sur Permutite, technique analogue à la chromatographie sur Delcaso, que nous effectuons sur une fraction déjà très active, au lieu de l'effectuer directement sur l'urine, et qui est suivie, comme ultime purification, d'une deuxième chromatographie sur Decalso ou sur Dowex 2, ou d'une électrophorèse de zone sur amidon.

Il n'est donc pas surprenant que l'hormone pure ainsi obtenue soit absolument différente du produit hormonal de GURIN (nous ne pouvons la comparer aux fractions terminales de KATZMAN ou de CLAEISSON, puisqu'on ne possède aucune donnée sur ces substances).

L'analyse élémentaire, déjà, montre cette dissemblance, surtout par les écarts qui existent entre les pourcentages d'azote et de carbone, 10,5 et 44,2 contre 12,03 et 50,4 pour le produit de GURIN, cette dernière valeur paraissant d'ailleurs élevée.

L'étude physique devait accentuer et préciser ce désaccord.

L'hormone isolée par GURIN n'a été soumise qu'à une seule électrophorèse en veine liquide, à la suite de laquelle elle est déclarée « très proche » de l'homogénéité. Le point isoélectrique a été déterminé par une méthode de microélectrophorèse d'une précision relative.

A l'ultracentrifugation, cette hormone s'avère « essentiellement monodispersée », sans que la variation de la vitesse de sédimentation en fonction de la concentration soit donnée.

— Notons qu'à l'époque où ces mesures ont été effectuées, l'appareillage qu'utilisaient les chercheurs était beaucoup moins perfectionné que celui dont on dispose actuellement.

Pour l'étude électrophorétique de notre hormone, trois tampons ont été employés, à huit pH différents, sans qu'une hétérogénéité apparaisse. Une courbe de mobilité en fonction du pH a été tracée mettant en évidence une mobilité beaucoup plus faible — 2,5 à pH 8,6 — que celle donnée par GURIN, et permettant une détermination graphique du point isoélectrique : pH 2,9 — 3. Cette valeur du pHi était précisée par deux électrophorèses effectuées à pH 2,9 et à pH 3, toutes choses égales par ailleurs : montrant une migration inversée de la frontière hormonale, elles fixaient le pHi, avec certitude, aux environs de 2,95.

Dans le cadre de cette étude électrophorétique, l'électrophorèse sur amidon (technique qui n'existait pas encore à l'époque où GURIN et LUNDGREN étudiaient cette hormone) jouait un double rôle. Pouvant servir d'ultime procédé de purification dans son rôle préparatif, elle était un critère de pureté supplémentaire et particulièrement démonstratif lorsqu'on y adjoignait la courbe d'activité biologique, en correspondance avec la courbe de concentration protéique.

Les études de sédimentation, effectuées dans un tampon phosphate et dans le chlorure de sodium 0,1 M, apportaient deux preuves de monodispersion par les clichés, d'une part, et par les courbes $S = f(C)$, d'autre part, qui sont des droites dont l'ordonnée à l'origine ($C = 0$) est identique dans les deux cas et égale à 2,7 S, valeur bien inférieure à celle donnée par LUNDGREN (4,3 S), qui ne correspondait d'ailleurs pas à l'extrapolation vers une dilution infinie mais à une concentration de 1,8 % d'hormone.

Dans l'étude de la diffusion, il est montré que la courbe $H = f(1/\sqrt{t})$ est une droite passant par l'origine. De plus, le coefficient de diffusion est calculé par trois méthodes différentes, avec une bonne concordance des résultats, la constance des valeurs obtenues pour différents rapports H_m/H dans la méthode des cordes étant encore une preuve de monodispersion.

La valeur moyenne obtenue, 8,2 est également fort différente de celle de LUNDGREN, 4,4.

Notons, à ce propos, que GURIN (1940) [204] prétendait la détermination de la constante de diffusion impossible, par suite de l'instabilité de l'hormone en solution. Cependant, deux ans plus tard (1942), LUNDGREN [205], déterminait cette constante avec une durée d'expérience proche de 70 heures. Ce doute que l'on

pouvait avoir quant à la dénaturation possible de l'hormone, au cours d'une telle expérience, nous l'avons levé, en vérifiant que l'hormone restait stable au moins trois jours en solution aqueuse.

Reste enfin, parmi les constantes physiques déterminées antérieurement, le volume spécifique partiel, qui est certainement la plus précise des diverses constantes déjà données. En effet, la formule qui permet de le calculer, montre que c'est la différence de poids entre un même volume de solvant et de solution qui donne, en définitive, la valeur du volume spécifique apparent (que l'on prend comme volume spécifique partiel dans le cas des faibles dilutions). Or, le premier chiffre significatif correspond aux milligrammes. Dans nos conditions d'expérience, la différence de poids entre solvant et solution était d'environ 5 mg. Il suffisait d'obtenir le 1/100^e de mg pour justifier la troisième décimale.

Là encore, une valeur plus faible que celle de LUNDGREN (donnée, d'ailleurs, sans autre explication, sinon que la possibilité d'une erreur était envisagée) : 0,727 contre 0,76. Il ne semble pas qu'il y ait de règles définies pour la valeur du volume spécifique des protéines, encore que l'on admette généralement un chiffre plus faible pour les glycoprotéines. 0,76 paraît cependant très élevé.

De ces résultats, GURIN déduisait un poids moléculaire minimum, compris entre 60.000 et 80.000. LUNDGREN, par la formule de Svedberg avançait le chiffre de 100.000.

En complète divergence, nous trouvons, par la même formule, un poids moléculaire de 30.000. De plus, une détermination était effectuée par la diffusion de la lumière. Cette méthode physique différente donnait une valeur de 29.000, et prenait ainsi une importance toute particulière, par la concordance des deux résultats.

Le poids moléculaire des protéines n'est sans doute qu'une approximation ; cependant, l'écart entre notre valeur et celle de LUNDGREN est trop important pour que l'on puisse ainsi le justifier. Certes, la préparation de GURIN qu'étudia LUNDGREN n'était pas absolument pure ; mais, la présence d'impuretés en faible proportion ne pouvait, à ce point, modifier les caractéristiques du principal constituant. Quoiqu'il en soit, ce poids moléculaire semble élevé, si l'on considère qu'il s'agit là d'une molécule que le filtre rénal laissa passer (sans qu'il n'y ait, d'ailleurs rien d'absolu à ce sujet).

La gonadotropine chorionique humaine existerait-elle sous plusieurs formes ? Une explication peut être fournie, que l'électrophorèse sur papier nous a laissé entrevoir. Nous avons montré (BOURRILLON et GOT, 1956) [206], grâce à cette technique, doublée du dosage biologique, que l'activité gonadotrope se répartissait sur plusieurs protéines dans les préparations peu purifiées, tandis qu'elle se situait sur une seule frontière dans les préparations hautement purifiées. Nous en avons conclu que l'hormone chorale est vraisemblablement excrétée dans l'urine sous forme de complexes protéiques labiles que la préparation permet de scinder. Ne pouvons-nous alors envisager que l'hormone de GURIN est encore un complexe que sa méthode de préparation n'a pas permis de dissocier, et dont l'analyse physique, relativement peu poussée, n'a pas mis en évidence l'hétérogénéité ?

Un exemple d'association entre protéine inactive et hormone glycoprotéique nous a déjà été donné par une substance similaire : l'hormone gonadotrope extraite du sérum de jument gravide (BOURRILLON et GOT, 1957) [207].

Notre méthode de préparation nous aurait permis de rompre toutes ces associations, et d'obtenir un produit final qui soit véritablement une entité.

Son homogénéité, sa monodispersion sont amplement démontrées par la conjonction des critères variés. Car à ceux qui ont été l'objet de la discussion ci-dessus, il faut encore ajouter l'étude de la solubilité qui est un des critères de pureté des protéines les plus rigoureux, mais qui cependant n'avait jamais été envisagé pour les préparations d'hormone effectuées jusqu'alors. Nous avons tracé une courbe qui est en accord avec la formule de COHN, à pH, température et concentration en protéine constants, et force ionique variable. Remarquons l'étroitesse de la zone de précipitation par le sulfate d'ammonium : 10 % de variation de concentration (49 à 59 % de saturation).

Des caractères de solubilité — dont certains sont en désaccord avec les résultats antérieurs, ce qui n'est pas surprenant car il s'agissait de préparations différentes —, il ressort que l'hormone est extrêmement soluble.

Enfin, si l'identification des résidus terminaux n'est pas un critère absolu de pureté, il n'en reste pas moins que l'absence de NH₂-terminal et l'unicité du COOH-terminal (le glyco-colle) impliquent la nécessité d'une chaîne polypeptidique unique.

Ont été également déterminés : le pouvoir rotatoire, $[\alpha]_D = -68^\circ$, valeur élevée pour une protéine, et le spectre dans l'U.V. dont le maximum, situé vers 278 m μ , donne pour $E_{1\%}^{1\text{ cm}}$ une valeur faible, 4,25, en rapport évidemment avec la faible teneur en tyrosine et en tryptophane.

Le rapport de friction est de 1,28. Ne sachant à quel type d'ellipsoïde de révolution la molécule hormonale pouvait être assimilée, nous n'avons pas utilisé les diagrammes d'ONCLEY.

La copule glucidique présente une importance capitale dans la caractérisation d'une glycoprotéine. Par les méthodes classiques de dosage des glucides, on n'avait qu'un aperçu sommaire de la constitution du groupement prosthétique, dont l'analyse qualitative et quantitative pouvait être réalisée par la chromatographie sur papier, introduite par PARTRIDGE (1948) [208]. Appliquant la technique de BOURRILLON et MICHON [209], nous avons pu faire une étude précise et approfondie de ce groupement, et apporter ainsi quelques données entièrement nouvelles.

TABLEAU XXIX

Nouvelles caractéristiques physico-chimiques de la gonadotropine chorionique humaine.

Activité (UI/mg).....	10.000 à 12.000
N (%).....	10,5
C (%).....	44,2
H (%).....	7,3
Taux en polypeptide (%).....	57
Constante de Sédimentation, S_{20} (cm.sec ⁻¹ dyne ⁻¹).....	$2,7 \times 10^{-13}$
Constante de Diffusion, D_{20} (cm ² sec ⁻¹).....	$8,2 \times 10^{-7}$
Volume spécifique partiel (ml/g).....	0,727
Poids moléculaire (formule de Svedberg).....	30.000
— (diffusion de la lumière).....	29.000
Rapport de friction.....	1,28
Mobilité électrophorétique, pH 8,6 $\mu = 0,1$ (cm ² sec ⁻¹ volt ⁻¹).....	$2,5 \times 10^{-5}$
Point isoélectrique.....	2,95
du/dpH ₀	$1,05 \times 10^{-5}$
$E_{1\%}^{1\text{ cm}}$	4,25
Mtyrosine/Mtryptophane.....	2,4
Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$	-68°
Résidu NH ₂ -terminal.....	néant
Résidu COOH-terminal.....	Glycolle
Hexoses (%).....	11
Mannose/Galactose.....	1
Fucose (%).....	1,2
Hexosamines (%).....	8,7
Glucosamine/Galactosamine.....	4
Hexoses/Hexosamines.....	1,26
Acides sialiques (%).....	8,5
Action folliculo-stimulante.....	néant
Action corticotrope.....	néant
Stimulation des cellules intersticielles.....	+++

Avant tout, il faut insister sur la nécessité absolue d'une étude cinétique de l'hydrolyse. En effet, les conditions idéales d'hydrolyse varient selon les glycoprotéines, les composants glucidiques étant plus ou moins rapidement libérées ou détruits. Ainsi, le dosage des sucres réducteurs totaux passe-t-il par un maximum qui ne correspond pas à la totalité des éléments réducteurs contenus dans la copule : ou la libération des oses neutres est totale, mais alors les osamines ne sont que partiellement libérées, ou bien, on libère totalement les osamines, mais les oses neutres sont en partie détruits. C'est pourquoi, deux hydrolyses étaient nécessaires pour une analyse quantitative. Plus même, l'hydrolyse des oses devait être pratiquée en deux temps : ainsi qu'on l'a vu, certains oses sont libérés de la molécule par une première hydrolyse, mais restant liés entre eux, ils ne migrent pas au cours de la

chromatographie, et leur détermination est impossible. Il faut donc éluer la zone de départ et hydrolyser l'éluat. Une deuxième chromatographie montre alors, à nouveau, du galactose et du mannose. Il faut admettre que les dosages effectués directement sur la molécule, ne donnent, malgré leur spécificité, qu'une idée incomplète de la copule. Seule la chromatographie, précédée des hydrolyses appropriées, a permis d'en déterminer les éléments variés et leur concentration relative. En plus des hexoses (mannose, galactose), du fucose, de la glucosamine, la présence plus rare de galactosamine et de plusieurs acides sialiques (dont, vraisemblablement, l'acide N-acétyl et l'acide N-glycolyl) montre la complexité de cette copule, et lui confère une originalité certaine.

La pureté physiologique de l'hormone, c'est-à-dire, l'unicité de son action, a été elle aussi l'objet d'investigations. L'absence d'activité folliculo-stimulante a été montrée par le test d'augmentation du poids des ovaires, chez le rat femelle impubère ; cependant que la chute de poids des capsules surrénales, chez des animaux hypophysectomisés, malgré des injections massives d'hormone pure, confirmait l'absence totale d'activité corticotrope.

La stimulation des cellules intersticielles de l'ovaire, chez l'animal hypophysectomisé (un temps de latence de trois semaines était respecté, entre l'hypophysectomie et le début des injections) était mise en évidence par une étude histologique ; l'hormone finale paraissait avoir une action plus intense, pour un même nombre d'unités injectées, que des préparations intermédiaires moins actives.

Enfin, l'étude de la stabilité de l'hormone en solution et sous l'action de divers enzymes glucidolytiques et protéolytiques nous ont amenés à conclure, devant sa fragilité, que l'activité physiologique est liée à l'intégralité de la molécule.

Les propriétés physiques, chimiques et biologiques de l'hormone issue de notre méthode de préparation, sont résumées dans le Tableau XXIX. Outre une caractérisation plus complète que celle de la préparation de GURIN, la comparaison entre les Tableaux XXVIII et XXIX met en lumière la dissemblance totale existant entre les deux hormones.

CONCLUSION

Une technique originale de préparation est réalisée : mettant en jeu des adsorptions croisées, des extractions ou des précipitations hydro-alcooliques à concentrations variables en alcool et à plusieurs pH, elle se termine, en une ultime purification, par des chromatographies sur échangeurs d'ions ou par électrophorèse préparative sur amidon. Ainsi est obtenue, à partir de l'urine de femme enceinte, une protéine de haute activité biologique, différente des produits similaires précédemment décrits.

Sur le plan physique, sa monodispersion est démontrée par un faisceau de critères : électrophorèse libre ou sur amidon, ultracentrifugation, diffusion, courbe de solubilité.

Ses principales constantes physiques sont déterminées.

Son poids moléculaire est calculé par deux méthodes distinctes, dont les résultats sont en parfaite concordance.

Sur le plan chimique, sont effectuées l'analyse élémentaire, la caractérisation des résidus terminaux et l'analyse quantitative des acides aminés.

De plus, la nature glycoprotéique de cette hormone étant connue, sa copule glucidique est l'objet d'une étude approfondie : la complexité et la variété des constituants sont ainsi montrées.

En physiologie, enfin, l'unicité de son action a été confirmée.

En conséquence, il paraît justifier de considérer cette hormone comme une entité, dont les caractères physiques, chimiques et biologiques sont clairement définis.

Mais, reprenant la définition que donnait PEDERSEN d'une molécule de protéine, sommes-nous en présence de « la plus petite particule possédant les propriétés » de la substance envisagée ?

Les études effectuées sur diverses actions enzymatiques, nous ont montré que l'intégrité de cette molécule paraît indispensable au maintien de l'activité biologique.

On peut donc prétendre que cet hormone est arrivée à son état de pureté, la relative faiblesse de son poids moléculaire étant un argument supplémentaire.

Cependant, si l'on admet que l'action biologique est la caractéristique essentielle d'une hormone, les progrès constants de la biochimie n'interdisent pas d'envisager l'isolement d'une substance nouvelle possédant cette action, mais physiquement et chimiquement différente.

BIBLIOGRAPHIE

- ABRAMOWITZ A.-A. et HISAW F.-L. — 1939, *Endocrinology*, **25**, 633 [194].
 ALBERT A. et BERKSON J. — 1951, *J. Clin. Endocrinol.*, **11**, 805 [43].
 ASCHHEIM S. — 1927, *Klin. Wochschr.*, **6**, 135 [4].
 ASCHHEIM S. — 1942, *J. Lab. Clin. Med.*, **27**, 547 [27].
 ASCHHEIM S. et ZONDEK B. — 1927, *Klin. Wochschr.*, **6**, 1322 [1, 39].
 ASCHHEIM S. et ZONDEK B. — 1928, *Klin. Wochschr.*, **7**, 8 [2, 21].
 ASCHHEIM S. et ZONDEK B. — 1928, *Klin. Wochschr.*, **7**, 1453 [40].
 BARLOW O.-W. et SPRAGUE K.-D. — 1941, *Endocrinology*, **28**, 203 [28].
 BEARD H.-H. — 1957, *Enzymologia (Pays-Bas)*, **18**, 293 [195].
 BEAVEN G.-H. et HOLIDAY E.-R. — 1952, *Adv. Protein Chem.*, **7**, 319 [136].
 BISCHOFF F. — 1946, *J. Biol. Chem.*, **165**, 399 [192].
 BISERTE G. et OSTEUX R. — 1951, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 50 [149].
 BLIX G. — 1936, *Z. Physiol. Chem.*, **240**, 43 [168].
 BLIX G. — 1958, *Ciba Foundation Symposium on the Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides*, London [190].
 BOMAN H.-G. et WESTLUND L.-E. — 1956, *Arch. Biochem. Biophys.*, **64**, 217 [87].
 BOULANGER P. et BISERTE G. — 1949, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **31**, 696 [154].
 BOURRILLON R. et GOT R. — 1955, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **37**, 915 [101].
 BOURRILLON R. et GOT R. — 1956, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **38**, 1165 [94, 98, 206].
 BOURRILLON R. et GOT R. — 1957, *Acta Endocrinol.*, **24**, 82 [207].
 BOURRILLON R. et MICHON J. — 1958, *Bull. Soc. Chim. Biol. (sous presse)* [184, 185, 209].
 BOWMAN D.-E. — 1941, *J. Biol. Chem.*, **137**, 293 [31].
 BRADBURY J.-T., BROWN E.-S. et BROWN W.-E. — 1949, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **71**, 228 [64].
 BRADISH C.-J. — 1954, *Nature*, **174**, 272 [102].
 BROWN W.-E. et BRADBURY J.-T. — 1947, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **53**, 749 [17].
 BROWNE J.-S.-L. et VENNING E.-H. — 1936, *Lancet*, **2**, 1507 [35, 54].
 BROWNE J.-S.-L. et VENNING E.-H. — 1936, *Am. J. Physiol.*, **116**, 18 [54].
 BRUCKNER J. — 1955, *Biochem. J.*, **60**, 200 [188].
 BUKOVICS E. et WOHLZOGEN F.-X. — 1953, *Acta Endocrinol.*, **14**, 273 [30].
 BULL H.-B. — 1935, *J. Phys. Chem.*, **39**, 577 [114].
 Bulletin Organisation Hygiène, S.D.N. — 1939, **8**, 884 [29].
 BURDICK H.-O. — 1946, *Am. J. Physiol.*, **145**, 387 [24].
 BUTT W.-R. et CROOKE A.-C. — 1953, *Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology*, London, **5**, 44 [73].
 BUTTLER A.-M. et MONTGOMERY H. — 1933, *J. Biol. Chem.*, **99**, 173 [116].
 CARLSON L.-A. — 1954, *Acta Chem. Scand.*, **8**, 510 [100].
 CHIBNALL A.-C. — 1953, *Institut International de Chimie Solvay*, 9^e conseil de Chimie. Les Protéines [144].
 CLAESSON L., HOGBERG B., ROSENBERG Th. et WESTERMAN A. — 1948, *Acta Endocrinol.*, **1**, 1 [19, 69, 110].
 COHN E.-J. — 1925, *Phys. Rev.*, **5**, 349 [115].
 COLLIP J.-B. — 1930, *Canad. Med. Assoc. J.*, **22**, 215 ; 1934, *J. Mt. Sinai Hosp. N.Y.*, **1**, 28 ; 1935, *Am. Intern. Med.*, **9**, 150 [5].
 COLLIP J.-B., SELYE H., ANDERSON E.-M. et THOMSON D.-L. — 1933, *J. Am. Med. Assoc.*, **101**, 1553 [5].
 COLLIP J.-B., SELYE H. et THOMSON D.-L. — 1933, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **30**, 544 ; 1933, *Nature*, **131**, 56 [10].
 COURTOIS J. — 1956, *Acquisitions récentes dans le domaine de l'analyse des glucides. Mises au point de chimie analytique. 4^e série*, Masson éd. [183].
 CROOKE A.-C. et BUTT W.-R. — 1952, *Proc. Roy. Soc. Med.*, **45**, 805 [73].
 CROOKE A.-C., BUTT W.-R., INGRAM J.-D. et ROMANCHUCK L.-E. — 1954, *Lancet*, **1**, 379 [31, 73].
 DEANESLY R. — 1935, *Quart. J. Pharm. Pharmacol.*, **8**, 651 [5].

(Les numéros entre crochets qui suivent les références correspondent à l'ordre d'apparition des citations dans le texte.)

- DICKENS F. — 1930, *Biochem. J.*, **24**, 1507 [45, 192].
- DICZFALUSY E. — 1953, *Acta Endocrinol.* **12** Suppl., 12 [30, 43].
- DICZFALUSY E. — 1954, *Acta Endocrinol.*, **17**, 58 [30, 36, 38].
- DICZFALUSY E., HOGBERG B. et WESTMAN A. — 1950, *Acta Endocrinol.*, **5**, 226 [37].
- DICZFALUSY E. et LORRAINE J.-A. — 1955, *J. Clin. Endocrinol. Metabolism.*, **15**, 424 [30].
- DISCHE Z. — 1930, *Mikrochemie*, **8**, 4 [161].
- DISCHE Z. et OSNOS M. — 1952, *Feder. Proc.*, **11**, 202 [167].
- DISCHE Z. et SHETTLES L.-B. — 1948, *J. Biol. Chem.*, **175**, 595 [173].
- DOTY P. et GEIDUSCHEK E.-P. — 1953, *The Proteins*, Academic Press. éd., New York, **1A**, 393 [135].
- DRESCHER J. — 1954, *Acta Endocrinol.*, **15**, 325 [5].
- DUSTIN J.-P., WODON C., MERARD O. et BIGWOOD E.-J. — 1952, *Ann. Endocrinol.*, **13**, 867 [91, 95].
- EDSALL J.-T. — 1953, *The Proteins*, Academic Press. éd., New York, **1B**, 562 [120, 125].
- EINSTEIN A. — 1905, *Ann. Physik.*, **17**, 549; 1905, *Ann. Physik*, **19**, 371 [132].
- ELSON L.-A. et MORGAN W.-T.-J. — 1953, *Biochem. J.*, **27**, 1824 [174].
- ENGLE E.-T. — 1929, *J. Am. Med. Assoc.*, **93**, 276 [5].
- EVANS H.-M. — 1936, *Western J. Surg. Obstet. Gynecol.*, **44**, 175, 199 [34].
- EVANS H.-M., KOHLS C.-L. et WONDER D.-H. — 1937, *J. Am. Med. Assoc.*, **108**, 287 [44, 55].
- EVANS H.-M., MEYER K. et SIMPSON M.-E. — 1932, *Am. J. Physiol.*, **100**, 141 [14].
- EVANS H.-M. et SIMPSON M.-E. — 1950, *The Hormones*, Academic Press. éd., New York, **2**, 351 [12].
- EVANS H.-M. et SIMPSON M.-E. — 1929, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **26**, 595 [44].
- FEVOLD H.-L. et HISAW F.-L. — 1934, *Am. J. Physiol.*, **109**, 655 [14].
- FISCHER F.-G. et ERTHEL L. — 1931, *Z. Physiol. Chem.*, **202**, 83 [156].
- FLODIN P. et PORATH J. — 1954, *Biochim. Biophys. Acta*, **13**, 175 [100].
- FONSS-BECH P. et LI C.-H. — 1954, *J. Biol. Chem.*, **207**, 175 [99].
- FOSCO A.-L. — 1943, *Montash. Geburts. u. Gynärk.*, **116**, 36 [42].
- FRAENKEL-CONRAT H., HARRIS J.-I. et LEVY A.-L. — 1955, *Methods of Biochemical Analysis* (Glick D.), Interscience Pub., **2**, 359 [153].
- FRANCK R.-T. et SALMON U.-J. — 1935, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **32**, 1237 [53].
- FRANCK R.-T., SALMON U.-J. et FRIEDMAN R. — 1935, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **32**, 1666 [53].
- FRIEDMAN M.-H. — 1929, *Am. J. Physiol.*, **90**, 617 [2, 22].
- FRIEDMAN M.-H. — 1932, *J. Pharmacol. Exptl. Ther.*, **45**, 7; 1939, *Endocrinology*, **24**, 617 [60].
- FRIEDMAN M.-H. et LAPHAM M.-E. — 1931, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **21**, 405 [22].
- GADDUM J.-H. — 1950, *J. Endocrinol.*, **6**, 330 [30].
- GALLI-MAININI C. — 1947, *Semana Med. Buenos-Aires*, **1**, 337 [25].
- GEY G.-O., SEEGER G.-E. et HELLMAN L.-M. — 1938, *Science*, **88**, 306 [6].
- G MORI G. — 1946, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **62**, 33 [88].
- GOODWIN T.-W. et MORTON R.-A. — 1946, *Biochem. J.*, **40**, 628 [142].
- GREEN N.-M. et NEURATH H. — 1954, *The Proteins*, Academic Press éd., New York, **2**, 1057 [151].
- GRIDGEMAN N.-T. — 1951, Report on the 2nd Collaborative Test of photoelectric Spectrophotometers by the Photoelectric Spectrophotometry Group (W.-H. Storey, Arbury Works, Cambridge, England), Bull. n° 4, 67 [137].
- GUINAND S. et JOLIOT P. — 1957, *J. Chimie Phys.*, **54**, 239 [131].
- GUINAND S. et TONNELAT J. — 1954, *J. Chimie Phys.*, **51**, 276 [131].
- GURIN S. — 1942, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **49**, 48 [163].
- GURIN S. — 1944, *The Chemistry and Physiology of Hormones*, American Association for the Advancement of Science, Washington, D.C., p. 144 [58, 108, 117, 139, 191].
- GURIN S., BACHMAN C. et WILSON D.-W. — 1938, *J. Biol. Chem.*, **123**, 49 [56].
- GURIN S., BACHMAN C. et WILSON D.-W. — 1939, *J. Biol. Chem.*, **128**, 525 [56, 81, 82, 129, 192].
- GURIN S., BACHMAN C. et WILSON D.-W. — 1940, *J. Biol. Chem.*, **133**, 467; 1940, *J. Biol. Chem.*, **133**, 177 [57, 61, 107, 113, 163, 200, 204].
- GURIN S., BACHMAN C. et WILSON D.-W. — 1939, *Science*, **89**, 62 [158, 163].
- GURIN S., BACHMAN C. et WILSON D.-W. — 1939, *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 2251 [107].
- GURIN S. et HOOD D.-B. — 1939, *J. Biol. Chem.*, **131**, 211 [162].
- HAGLUND H. et TISELIUS A. — 1950, *Acta Chem. Scand.*, **4**, 957 [102].
- HAMBURGER C. — 1933, *C. R. Soc. Biol.*, **112**, 99 [5].
- HARTMANN M. et BENZ F. — 1938, *Nature*, **142**, 115 [159].
- HELLER C.-G., LAUSON H. et SEVRINGHAUS E.-L. — 1938, *Am. J. Physiol.*, **121**, 363 [26].
- HERZOG R.-O., ILLIG R. et KUDAR H. — 1934, *Z. Physik. Chem.*, **A167**, 329 [133].
- HIROSE T. — 1920, *Kini-Fukinka-Gakkai-Zasshi*, **16**, [3].
- HOGGEN L., CHARLES E. et SLOME D. — 1931, *J. Exptl. Biol.*, **8**, 345 [23].
- HON E.-L. et MORRIS J.-M. — 1955, *Yale J. Biol. Med.*, **27**, 178 [76].
- JANSEN E.-F., NUTTING M.-D., JANG R. et BALLS A.-K. — 1948, *J. Biol. Chem.*, **179**, 189 [152].
- JERMYN M.-A. et ISHERWOOD F.-A. — 1949, *Biochem. J.*, **44**, 402 [182].
- KATZMAN P.-A. et DOISY E.-A. — 1932, *J. Biol. Chem.*, **98**, 739 [51, 59, 70, 80, 90].
- KATZMAN P.-A. et DOISY E.-A. — 1933, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **30**, 1188; 1934, *J. Biol. Chem.*, **107**, 513 [49].
- KATZMAN P.-A. et DOISY E.-A. — 1934, *J. Biol. Chem.*, **106**, 125 [51].
- KATZMAN P.-A., GODFRID M., CAIN C.-K. et DOISY E.-A. — 1943, *J. Biol. Chem.*, **148**, 501 [66, 78, 86, 109, 202].
- KIDO I. — 1937, *Zbl. Gynakol.*, **61**, 1551 [8].
- KLENK E. et LANGERBEINS H. — 1941, *Z. Physiol. Chem.*, **270**, 185, [176].

- KLENK E. et UHLENBRUCK G. — 1957, Hoppe-Seiler's Z. Physiol. Chem., **307**, 266 [189].
- KLEVSTRAND R. et NORDAL A. — 1950, Acta Chem. Scand., **4**, 1320 [186].
- KLUNGSOYR L. et STOA K.-F. — 1955, Acta Endocrinol., **18**, 288 [166].
- KUNKEL H.-G. et SLATER R.-J. — 1952, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **80**, 42 [96, 99, 103].
- KUNKEL H.-G. et SLATER R.-J. — 1952, J. Clin. Invest., **31**, 677 [103].
- LAMM O. et POLSON A. — 1936, Biochem. J., **30**, 528 [119].
- LANDGREBE F.-W. — 1948, Proc. Roy. Soc. Edinburgh, **B63**, 213 [23].
- LANDGREBE F.-W., HOBSON B.-M. et MITCHELL G.-M. — 1954, Quart. J. Exptl. Physiol., **39**, 309 [77].
- LEJWA A. — 1932, Biochem. Z., **256**, 236 [67].
- LEONARD S.-L. — 1932, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **30**, 403 [14].
- LEONARD S.-L. — 1934, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **31**, 1156 [13].
- LEONARD S.-L. et SMITH P.-E. — 1934, Anat. Record., **58**, 175 [10].
- LEONARD S.-L. et SMITH P.-E. — 1934, Am. J. Physiol., **108**, 22 [11].
- LEVIN L. — 1944, The Chemistry and Physiology of Hormones, American Association for the Advancement of Science, Washington, D.C., p. 162 [9].
- LEVY A.-L. — 1954, Nature, **174**, 126 [199].
- LEVY A.-L. — 1955, Methods of Biochemical Analysis (Glick D.), Interscience Pub. **2**, [145].
- LI C.-H. — 1949, Vitamins and Hormones, **7**, 223 [71, 140, 192].
- LIU S.-H. et NOBLE R.-L. — 1939, J. Endocrinol., **1**, 7 [12].
- LONGWORTH L.-G. — 1947, J. Am. Chem. Soc., **69**, 2510 [124].
- LONGWORTH L.-G. — 1951, Anal. Chem., **23**, 346 ; 1952, J. Am. Chem. Soc., **74**, 4155 [121].
- LORAINÉ J.-A. — 1950, J. Endocrinol., **6**, 319 [36, 41, 65].
- LORAINÉ J.-A. — 1956, Vitamins and Hormones, **14**, 305 [32, 33].
- LORAINÉ J.-A. et BROWN J.-B. — 1954, Acta Endocrinol., **17**, 250 [74, 84, 85].
- LOWRY O.-H., ROSEBROUGH N.-J., FARR A.-L. et RANDALL R.-J. — 1951, J. Biol. Chem., **193**, 265 [104].
- LUGG J.-W.-H. — 1937, Biochem. J., **32**, 775 [141].
- LUNDGREN H.-P., GURIN S., BACHMAN C. et WILSON D.-W. — 1942, J. Biol. Chem., **142**, 367 [62, 107, 123, 126, 128, 201, 205].
- LUSTIG B. et LANGER A. — 1931, Biochem. Z., **242**, 320 [171].
- LYONS R.-A., SIMPSON M.-E. et EVANS H.-M. — 1953, Endocrinol., **53**, 674 [20].
- MARTENSON E., RAAL A. et SVENNERHOLM L. — 1958, Biochim. Biophys. Acta, **30**, 124 [178].
- MEYER K. — 1937, The Endocrines in Obstetrics and Gynecology. Kurzrock R. ed., p. 115 [52, 157].
- MEYER K., DAVIDSON E., LINKER A. et HOFFMAN P. — 1956, Biochim. Biophys. Acta, **21**, 506 [83].
- MEYER K., LINDER A., DAVIDSON E.-A. et WEISSMAN B. — 1953, J. Biol. Chem., **205**, 611 [83].
- MICHL H., RIEDL K. et WESSELY F. — 1951, Monatsh., **82**, 539 [89, 95].
- MICHON J. et BOURRILLON R. — 1958, Bull. Soc. Chim. Biol. (sous presse) [187].
- MILTON R.-F. — 1946, Brit. Med. J., **2**, 328 [68].
- MONTREUIL J. — 1957, Les Glycoprotéides. IV^e Journées Biochimiques, Montpellier [177].
- MOORE S. et STEIN W.-H. — 1954, J. Biol. Chem., **211**, 893 [196].
- MOORE S. et STEIN W.-H. — 1954, J. Biol. Chem., **211**, 907 [197].
- MOORE D.-H. et WHITE J.-U. — 1950, Medical Physics, Otto Glasser ed., **2** [122].
- MORRIS P.-D. — 1955, Brit. Med. Bull., **11**, 101 [79, 111, 165, 192].
- MURATA A. et ADACHI K. — 1927, Z. Geburtshilfe u. Gynakol., **92**, 45 [4].
- NEURATH H. — 1942, Chem. Revs., **3**, 397 [119].
- NEURATH H., GLADNER J.-A. et DAVIE E.-W. — 1954, The Mechanism of Enzyme Action, Mc Elroy W.-D. et Glass B. eds. Baltimore, p. 50 [150].
- NIKKILA E.-A., HAAHTI E. et PESOLA R. — 1953, Acta Chem. Scand., **7**, 1222 [99].
- NOBLE R.-L. et PLUNKETT E.-R. — 1955, Brit. Med. Bull., **11**, 98 [9].
- ODEBLAD E. — 1955, Acta Endocrinol., **18**, 291 [130].
- ONCLEY J.-L. — 1941, Ann. N.Y. Acad. Sci., **41**, 121 [134].
- PARTRIDGE S.-M. — 1948, Biochem. J., **42**, 238 [208].
- PEDERSEN K.-O. — 1953, Institut International de Chimie Solvay, 9^e Conseil de Chimie. Les Protéines, p. 19 [127].
- PERRIN F. — 1936, J. Phys. Radium, **7**, 1 [133].
- PHILLIP E. — 1930, Zbl. Gynakol., **54**, 450, 1858 [5].
- PORTER R.-R. — 1951, Methods Med. Research, **3**, 256 [146].
- PORTER R.-R. et SANGER F. — 1948, Biochem. J., **42**, 287 [148].
- RAACKE I.-D. et LI C.-H. — 1954, Biochim. Biophys. Acta, **14**, 290 ; 1955, J. Biol. Chem., **215**, 277 [96].
- RAACKE I.-D., LI C.-H. et LOSTROH A. — 1954, Acta Endocrinol., **17**, 366 [97, 105].
- REISS M., SCHAFFNER A. et HAUROWITZ F. — 1931, Endocrinol., **8**, 22 [47].
- REISS M. et HAUROWITZ F. — 1929, Z. ges. Exptl. Med., **63**, 371 [193].
- RIMINGTON C. — 1940, Biochem. J., **34**, 931 [175].
- ROVERY M., FABRE C. et DESNUELLE P. — 1953, Biochim. Biophys. Acta, **12**, 547 [147].
- SANGER F. — 1945, Biochem. J., **39**, 507 [143].
- SANNICANDRO G. — 1934, Ann. Obstet. Gynecol., **56**, 3 [6].
- SCHMIDT A.-A. et DERANKOWA E. — 1931, Ztschr. g. die Gesam. Exptl. Med., **78**, 361 [46].
- SCHNEIDER II. et BIRTEL F. — 1955, J. Klin. Wochschr., **43-44**, 1175 [93].
- SCOTT L.-D. — 1941, Brit. J. Exptl. Path., **21**, 320 [63, 84].
- SEALEY J.-L. et SONDERN C.-W. — 1940, Endocrinol., **26**, 813 [37].
- SEEGAR-JONES G.-E., GEY G.-O. et GEY M.-K. — 1943, Bull. Johns Hopkins Hosp., **72**, 26 [6].

- SEGALOF A., STERNBERG W.-H. et GASKILL C.-J. — 1951, *J. Clin. Endocrinol.*, **11**, 936 [18].
- SIMPSON M.-E., LI C.-H. et EVANS H.-M. — 1951, *Endocrinol.*, **48**, 370 [15].
- SMITH R.-A., ALBERT A. et RANDALL L.-M. — 1951, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **61**, 514 [43].
- SMITH O.-W. et SMITH G.-V. — 1937, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **33**, 365 [55].
- SMOLUCHOWSKI M. — 1906, *Ann. Physik.*, **21**, 756 [132].
- SOMOGYI M. — 1945, *J. Biol. Chem.*, **160**, 61 [172].
- SORENSEN M. et HAUGAARD G. — 1933, *Biochem. Z.*, **260**, 247 [160].
- SORET J.-L. — 1883, *Arch. Sci. Phys. Nat.*, **1**, 429 [138].
- SPIELMAN M.-A. et MEYER R.-K. — 1938, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **37**, 623 [112].
- STEELE B.-F., SAUBERLICH H.-E., REYNOLDS M.-S. et BAUMANN C.-A. — 1949, *J. Biol. Chem.*, **177**, 533 [198].
- STEELMAN S.-L. et POHLEY F.-M. — 1953, *Endocrinol.*, **53**, 604 [16].
- STEWART H.-L. — 1951, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **61**, 990 [8].
- STEWART H.-L., SANO M.-E. et MONTGOMERY T.-L. — 1948, *J. Clin. Endocrinol.*, **8**, 175 [6].
- STRAN H.-M. et SEEGAR-JONES G.-E. — 1954, *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **95**, 162 [31, 92, 95].
- SVENNERHOLM L. — 1956, *Acta Soc. Med. Upsaliensis*, **61**, 75 [179].
- SWINGLE S.-M. et TISELIUS A. — 1951, *Biochem. J.*, **48**, 171 [72].
- TISELIUS A. — 1937, *Trans. Faraday Soc.*, **33**, 524 [106].
- VENNING E.-H. — 1955, *Brit. Med. Bull.*, **11**, 140 [40].
- WALDRON D.-M. — 1952, *Nature*, **170**, 461 [167].
- WATTS R.-M. et ADAIR F.-L. — 1943, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **46**, 183 [37].
- WEIMER H.-E. et MOSHIN J.-R. — 1952, *Am. Rev. Tuberculosis*, **68**, 594 [170].
- WERNER I. et ODIN L. — 1952, *Acta Soc. Med. Upsalienis*, **57**, 230 [177].
- WIESNER B.-P. et MARSHALL P.-G. — 1931, *Quart. J. Exptl. Physiol.*, **21**, 147 [193].
- WINZLER J. — 1955, *Methods of Biochemical Analysis* (Glick D.), Interscience Pub., **2**, 279 [169, 175].
- WISLOCKI G.-B. et BENNETT H.-S. — 1943, *Am. J. Anat.*, **73**, 335 [7].
- YAMASHINA I. — 1956, *Acta Chem. Scand.*, **10**, 1666 [180].
- ZILLIACUS W. — 1953, *Gynaecologia*, **135**, 161 [7].
- ZILLIACUS W. et ROOS B.-E. — 1951, *Acta Endocrinol.*, **6**, 147 [164].
- ZITTLE C.-A. — 1953, *Advances in Enzymology*, **14**, 319 [50].
- ZONDEK B. — 1930, *Klin. Wochschr.*, **9**, 964 [44].
- ZONDEK B. — 1935, *Die Hormone des Ovariums und des Hypophysenvorderlappens*, Vienna [40].
- ZONDEK B. et ASCHHEIM S. — 1928, *Klin. Wochschr.*, **7**, 1401 [44].
- ZONDEK B., SCHEIBLER H. et KRABBE W. — 1933, *Biochem. Z.*, **258**, 102 [48].

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

« **Leucine-aminopeptidase** »

Vu et approuvé :

Paris, le 10 Mars 1959

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PERES

Vu et Permis d'imprimer :

*Le Recteur de l'Académie
de Paris,*

Jean SARRAILH

Société Saint-Quentinoise d'Imprimerie
119, rue Saint-Maur - PARIS-XI^e
